

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de materiales poliméricos selectivos para el control
de la calidad y la seguridad alimentaria**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Rico Yuste

Directores

María Cruz Moreno Bondi
Javier Lucas Urraca Ruiz

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**DESARROLLO DE MATERIALES
POLIMÉRICOS SELECTIVOS PARA EL
CONTROL DE LA CALIDAD Y LA
SEGURIDAD ALIMENTARIA**

Directores:

Dra. María Cruz Moreno Bondi
Catedrática de Universidad

Dr. Javier Lucas Urraca Ruiz
Profesor Contratado Doctor Interino

TESIS DOCTORAL QUE PRESENTA

ALBERTO RICO YUSTE

Madrid, 2018



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

MARIA CRUZ MORENO BONDI, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD, Y JAVIER L. URRACA RUIZ PROFESOR CONTRATADO DOCTOR INTERINO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACEN CONSTAR,

Que el trabajo titulado "Desarrollo de materiales poliméricos selectivos para el control de la calidad y la seguridad alimentaria" ha sido realizado bajo su dirección en el Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA), de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, constituyendo la Tesis Doctoral de su autor, Alberto Rico Yuste.

Madrid, 4 de septiembre de 2018

Fdo. María Cruz. Moreno Bondi

Fdo. Javier L. Urraca Ruiz

Fdo. Alberto Rico Yuste

Agradecimientos

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a mis directores de Tesis: a la Prof. María Cruz Moreno Bondi por su confianza durante todos estos años (incluyendo cuando aún no me había licenciado), por enseñarme en que consiste la Ciencia, por incitar a cuestionarme y discutir cada paso dado y cada resultado obtenido, los distintos aspectos científicos con los que me he enfrentado, por alentarme a continuar a pesar de que las cosas se torcieran y por darme la oportunidad de haber podido dedicarme durante este tiempo a la investigación; al Prof. Javier Lucas Urraca Ruiz por su paciencia, por aprender conmigo, por enseñarme todo lo que sabía y empujarme a conocer aún más, por las risas y los momentos divertidos. En definitiva, gracias a los dos por demostrarme de lo que soy capaz.

Asimismo, he de agradecer la excelente acogida que recibí en los grupos de investigación en los que tuve la oportunidad de realizar estancias pre-doctorales, durante el transcurso de esta Tesis: a los grupos de la Prof. Sarah de Saeger (Laboratorio de Análisis de Alimentos, Universidad de Gante) y de los Profe Sergey Piletsky y Elena Piletska (Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Leicester).

A todas y cada una de las personas con las que he tenido la oportunidad de colaborar en los diferentes trabajos y que aportaron su granito de arena para que todos los trabajos llegaran a buen puerto: a la Prof. Elena Benito Peña, a la Dra. Victoria González de Vallejo, al Dr. Tomás de las Casas Engel, a la Dra. Rahma Abou Hany, a la Prof. Ana Belén Descalzo, a la Lda. Lidia Gómez Arribas y a la Prof. Concepción Pérez Conde (UCM); a la Dra. Letricia Barbosa Pereira y al Prof. Jose Manuel Cruz Freire (UV, Vigo); a Ainhoa Bilbao (Gaiker, Bizkaia); a la Prof. Carmen Álvarez Lorenzo (USC, Santiago de Compostela); al Dr. Jeroen Walravens y a la Prof. Sarah de Saeger (*Laboratory of Food Analysis*, Gante) y al Prof. Mychael Rychlik (TUM, Munich).

Los trabajos de investigación recogidos en esta Tesis fueron financiados por el MINECO (CTQ2012-37573-C02-01 y CTQ2015-69278-C2-1-R/AIE). También me gustaría agradecer al MINECO por la concesión de una ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores (BES-2013-063012) y las ayudas a la movilidad predoctoral para

la realización de estancias breves en centros de I+D españoles y extranjeros (EEBB-I-15-09859, EEBB-I-16-11665 y EEBB-I-17-12371), con el objetivo de obtener la Mención de Doctor Internacional.

Agradecer también al Dpto. de Química Analítica donde se ha llevado a cabo esta tesis y a los miembros de este por su recibimiento, ayuda, apoyo, acogida y compañía. Asimismo, al grupo de investigación GSOLFA y al director del grupo, el Prof. Guillermo Orellana, por permitirme realizar este trabajo de investigación con ellos y por sus aportaciones tanto a los diferentes trabajos como a su disponibilidad a la hora de precisar consejo o discutir determinados temas. A todos los miembros del grupo, tanto los que han estado como los que siguen allí, porque de una manera u otra hemos compartido muy buenos momentos, conversaciones y experiencias de las que uno se lleva en el recuerdo. A Josito Tower, JoseKiu e Idoia por ser mis *supports* y estar siempre dispuestos a echarme una mano en el desconocido mundo de la química orgánica, sin haberme matado tras preguntar siempre lo mismo. A Maxi por solucionarme la mayoría de los problemas (tanto científicos como logísticos) y por tener siempre una sonrisa y una buena cara, así como su disposición a escuchar lo que fuera necesario contar. A Riikka por su preocupación y por estar siempre dispuesta a revisar aquellos textos en inglés que precisaban otra mirada. A Mar y Bea por ser mis compañeras de laboratorio (durante poco tiempo) y por siempre encontrar un motivo para hacerme reír. A Lidia por soportarme, por escucharme, por estar a mi lado, por soportar mi música y enseñarme otra desconocida para mi y, en definitiva, por ser tu (siempre me acordare de *Richard*).

Quiero hacer una mención especial a Erika por ser la primera persona en despertarme el interés por la investigación y darme las primeras nociones sobre el trabajo y la dedicación a este mundo. A Vito por acompañarme durante un tiempo y ayudarme a sacar las cosas adelante, así como enseñarme a interpretar espectros de protón y a pasar buenos momentos entre cervezas y fibras. A Elena por enseñarme durante los primeros años de mi andanza científica, por tu cariño, tu preocupación, tu ejemplo y tu capacidad de superación. Gracias por reír y llorar conmigo y ayudarme a descubrir lo bonito de este mundo. A Sonia, la Mamma, por tus consejos, tus llamadas, por estar pendiente en la distancia, por los buenos momentos y por el tiempo que le has dedicado a leerte y comentar esta Tesis a pesar de estar inmersa en una nueva aventura.

No me puedo olvidar de mis amigos: Almu, Ramiro, Henar, Ana, Laura, Nano, Vela, César y Loli; esa otra familia que uno encuentra un día y ya no quieres que se separen de ti. No importa la distancia o las circunstancias porque siempre me habéis acompañado, en los buenos y en los malos momentos. En especial quiero agradecer a mis tres chicas, que no fallan, que siempre se preocupan y con las que llevo toda una vida compartiendo todo lo que nos ocurre. Raquel, Marina y Patri (por ayudar con la corrección de esta Tesis), sin vosotras nada sería lo mismo, gracias de corazón.

A mis compañeros y amigos de la carrera: Javi, Marta R, Marta P, Ann, Yanhira, María, Inés, Sara y Laura. Porque durante estos años hemos compartido risas y agobios, noches eternas, exámenes y mucho cariño. Siempre habéis os habéis preguntado de cómo iba y al final hemos ido cada uno por nuestro camino, pero sin perder ese contacto. De todos siempre tendré un lugar especial para mi Ele porque simplemente eres genial y hemos pasado demasiadas horas juntos, me has aguantado mucho y siempre estás ahí.

A mi clan: Sergio, Alberto, Betty y Laura. Porque sois de esas personas que uno se encuentra en la vida fortuitamente y quieres que se queden para siempre. Entre humo y juegos hemos compartido grandes momentos y habéis entrado a formar parte de mi vida. Sabéis que no estaría escribiendo esto si no fuera por vosotros, ese empujón cuando las cosas se torcían. Además, os habéis leído esta Tesis para minimizar las erratas y hacer que todo quede más bonito. *You're my 1-up guys... sus como.*

Y, por último, pero no menos importante, a mi familia. A mi Pa, a mi Mama, y mi hermana porque me habéis tenido que sufrir y aguantar, pero se que me queréis. A mis tíos y primos por estar junto a mi y darme vuestro cariño a lo largo de estos maravillosos años. A mis abuelos, porque he aprendido mucho de vosotros y aunque algunos no lo podáis ver se que todos estas muy orgullosos, como lo habéis estado siempre. Por acompañarme cuando me iba a otro país dejando todo, no solo para visitarme sino para echarme una mano. En definitiva, he aprendido mucho de vosotros y aún nos queda mucho por disfrutar.

Puede que no sepa como terminé aquí, pero me llevo más de lo que traje. En definitiva... *Let it go...* Gracias

Alberto

*Audi famam illius
solus in hostes ruit
et patriam servavit.*

*Audi famam illius
cuncurrit quaeque
tetigit destruens.*

Audi famam illius

Audi famam illius

Spes omnibus

mihi quoque.

Terror omnibus

mihi quoque.

Ille Iuxta me.

Ille Iuxta me.

Socii sunt mihi

qui orim viri fortes

rivales que erant.

Saeve certando

pugnandoque

splendor crecit!

“Super Smash Bros Brawl”

"It's dangerous go alone take this..."

The Legend Of Zelda

Y así empezó esta aventura en la que aprendí:

Que la sabiduría no se encuentra solo en los libros, sino en la vida

Que el valor no consiste en no tener miedo sino, enfrentarse al él

Que el poder no significa pisar, sino superarse y avanzar

Pero lo más importante que aprendí

Es que nunca caminé solo

pues os tenía a vosotros a mi lado

Gracias

ÍNDICE



1. Índice de Figuras y Tablas	9
2. Abreviaturas y símbolos	21
3. <i>Summary</i>	33
4. Resumen	41
5. Introducción	49
5.1. Micotoxinas en alimentos	51
5.1.1. Importancia e interés de las micotoxinas	52
5.1.2. Clasificación de las micotoxinas	54
5.1.2.1. Alkaloides ergóticos	55
5.1.2.2. Aflatoxinas	56
5.1.2.3. Citrinina	57
5.1.2.4. Fumonisinias	59
5.1.2.5. Ocratoxinas	60
5.1.2.6. Patulina	62
5.1.2.7. Micotoxinas del género <i>Alternaria</i>	63
5.1.2.8. Tricotecenos	65
5.1.2.9. Zearalenona y derivados	66
5.1.2.10. Micotoxinas emergentes	67
5.1.3. Legislación	69
5.1.4. Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas	79
5.1.4.1. Tratamiento de la muestra: métodos de extracción, limpieza y preconcentración	79
5.1.4.2. Métodos de análisis cromatográficos	84
5.1.4.3. Métodos de análisis no cromatográficos	88
5.2. Moléculas indicadoras de frescura	98
5.2.1. Concepto de frescura	98
5.2.2. Origen y tipos de marcadores de frescura	99
5.2.2.1. Hipoxantina	100

5.2.2.2. Furfural e hidroximetilfurfural	103
5.2.2.3. Aminas biogénicas.....	105
5.2.3. Métodos de análisis de marcadores de frescura.....	105
5.2.3.1. Análisis de hipoxantina y otros metabolitos de ATP.....	106
5.2.3.2. Análisis de furfural e hidroximetilfurfural.....	107
5.2.3.3. Análisis de aminas biogénicas	112
5.2.3.4. Perspectivas para el análisis de marcadores de frescura.....	114
5.3. Desarrollo de envases activos y envases inteligentes	115
5.3.1. Envases activos. Aplicación como sistemas de liberación controlada	116
5.3.1.1. Clasificación de los envases activos.....	118
5.3.1.2. Aspectos legales y de seguridad	120
5.3.1.3. Aplicación de los sistemas de liberación controlada como envases activos	121
5.3.2. Antioxidantes en alimentos	123
5.3.2.1. Oxidación lipídica.....	123
5.3.2.2. Antioxidantes naturales	125
5.3.2.3. Ácido ferúlico.....	129
5.4. Polímeros de impronta molecular	132
5.4.1. Inicio y evolución de la impronta molecular.....	132
5.4.2. Conceptos básicos de la impronta molecular	134
5.4.3. Tipos de impronta molecular	137
5.4.3.1. Impronta covalente.....	138
5.4.3.2. Impronta no covalente	139
5.4.3.3. Impronta semicovalente	141
5.4.3.4. Impronta mediada por metales.....	142
5.4.4. Componentes de la mezcla de prepolimerización	142
5.4.5. Formatos físicos de los polímeros de impronta molecular	145
5.4.5.1. Polimerización en bloque	146
5.4.5.2. Partículas esféricas.....	146

5.4.5.3. Síntesis por moldeo	148
5.4.5.4. Partículas núcleo-recubrimiento	149
5.4.5.5. Membranas e hidrogeles	150
5.4.5.6. Nanogeles.....	151
5.4.6. Técnicas de caracterización de los polímeros de impronta molecular ...	152
5.4.6.1. Caracterización química	152
5.4.6.2. Caracterización morfológica.....	153
5.4.6.3. Caracterización de los sitios de unión específica. Isotermas de adsorción	155
5.4.7. Aplicaciones de los polímeros de impronta molecular	157
5.4.7.1. Técnicas de separación	157
5.4.7.2. Catálisis y síntesis	159
5.4.7.3. Biorremediación.....	161
5.4.7.4. Transporte y liberación de sustancias.....	162
5.4.7.5. Sensores	163
5.4.7.6. Pseudo-inmunoensayos	164
6. <i>Aim of research</i>	167
7. <i>Publicaciones científicas</i>	171
7.1. <i>Molecularly imprinted hydrogels as functional active packaging materials...</i>	173
7.2. <i>Furfural determination with disposable polymer films and smartphone-based colorimetry for beer freshness assessment</i>	201
7.3. <i>Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in foodstuffs by molecularly imprinted solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>	227
7.4. <i>Rapid determination of Alternaria mycotoxins in tomato samples by pressurised liquid extraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection</i>	257
7.5. <i>Molecularly imprinted polymer based sensor containing europium (III) ions for tenuazonic acid determination in food samples</i>	277

8. Discusión integradora	301
8.1. Hidrogeles de impronta molecular como materiales funcionales en envases activos.....	303
8.1.1. Síntesis de la molécula plantilla	303
8.1.2. Selección de los monómeros funcionales	304
8.1.3. Síntesis de los hidrogeles de impronta molecular.....	306
8.1.3.1. Estudio de la presencia de porógeno en la mezcla de prepolimerización.....	306
8.1.3.2. Estudio de la influencia del grosor de los hidrogeles	309
8.1.4. Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrogeles en simulantes alimentarios	311
8.1.5. Aplicación de los hidrogeles como sistemas de liberación controlada en muestras de mantequilla	315
8.2. Análisis de furfural empleando membranas poliméricas desechables y medidas colorimétricas con un smartphone para evaluar la frescura de la cerveza	317
8.2.1. Selección de reactivos para la formación de compuestos coloreados en presencia de aldehídos	317
8.2.2. Síntesis de polímeros de impronta molecular selectivos a furfural	318
8.2.2.1. Síntesis de MIPs utilizando tiofeno-2-carboxaldehído.....	318
8.2.2.2. Síntesis de MIPs utilizando ácido 2-tiofenocarboxílico.....	320
8.2.3. Síntesis de membranas sensoras selectivas a furfural.....	322
8.2.4. Estudios de reactividad cruzada	322
8.2.5. Evaluación de la respuesta al furfural en simulantes alimentarios	324
8.2.6. Validación mediante HPLC-DAD	326
8.2.7. Análisis de furfural en muestras de cerveza aplicando el método de adiciones estándar	328

8.3. Síntesis y aplicación de MIPs selectivos a alternariol y a su monometil éter al desarrollo de métodos analíticos para la determinación de dichas micotoxinas en alimentos	330
8.3.1. Estudio de interacciones de la molécula plantilla con VIPY mediante ¹ H RMN	331
8.3.2. Aplicación de los MIPs al análisis de alternariol y su monometil éter en alimentos empleando QuEChERS-MISPE-UPLC-MS/MS.....	333
8.3.2.1. Comparación de los MIPs sintetizados con VIPY y EAMA	333
8.3.2.2. Análisis de micotoxinas modificadas de <i>Alternaria</i>	335
8.3.3. Aplicación de los MIPs un método PLE-MISPE-HPLC-FLD.....	339
8.4. Síntesis de MIPs selectivos a ácido tenuazónico y aplicación al desarrollo de sensores ópticos	344
8.4.1. Síntesis de MIPs selectivos a TeA en formato de microesferas porosas.	345
8.4.1.1. Desarrollo de un método de HPLC-DAD para la determinación de TeA	346
8.4.1.2. Optimización de las condiciones instrumentales para la determinación de TeA utilizando los MIPs dopados con Eu	347
8.4.1.3. Optimización de las condiciones experimentales para la determinación de TeA utilizando los MIPs dopados con Eu	350
8.4.1.4. Aplicación de los MIPs dopados con Eu a la determinación de Eu en muestras de alimentos	350
8.4.2. Síntesis de MIPs en formato núcleo recubrimiento, SiO ₂ @MIP, selectivos a TeA	351
8.4.2.1. Síntesis de las partículas de SiO ₂	352
8.4.2.2. Funcionalización de las partículas de SiO ₂ con una agente RAFT	356
8.4.2.3. Síntesis de las partículas núcleo recubrimiento SiO ₂ @MIP	358
8.4.2.4. Evaluación del reconocimiento de las partículas SiO ₂ @MIP/NIP/CIP	362
9. Conclusions	367
10. Bibliografía	375

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. A) Sistema de anillos tetracíclicos derivado de la ergolina. B) Estructura química de la ergotamina.....	56
Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ y M ₂	57
Figura 3. Estructura química de la citrinina en sus dos formas tautoméricas.	58
Figura 4. Estructura química de la citrinina y sus derivados (fenol A, citrinina H ₂ , citrinina H ₁ y dicitrinina A) generados tras someter a la micotoxina a diversos tratamientos térmicos ²⁶	59
Figura 5. Estructura química de las fumonisinas ³²	60
Figura 6. Estructura química de las ocratoxinas A, B y C.....	61
Figura 7. Estructura química de la patulina.....	62
Figura 8. Estructura química del altenueno, alternariol, monometil éter de alternariol, altertoxinas I, II y III, tentoxina y ácido tenuazónico.....	63
Figura 9. Estructura química de las toxinas T-2 y HT-2 y del deoxivalenol	65
Figura 10. Estructura química de la zearalenona y sus derivados (α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanona, α -zearalanol, β -zearalanol)	67
Figura 11. Estructura química de la monilformina, beauvericina, ácido fusárico y ácido micofenólico	68
Figura 12. Esquema del mecanismo de degradación del ATP	102
Figura 13. Esquema de la reacción de Maillard, incluyendo la formación de α -dicarbonilos, furfural y 5-HMF, a partir de una pentosa (n = 2) y/o una hexosa (n = 3). (3,4-DDP: 3,4-didesoxipentosuleno-3-eno; 3,4-DDH: 3,4-didesoxihexosulosa-3-eno; 5-HMF: 5-hidroximetilfurfural). Adaptado de la referencia 156.....	104
Figura 14. Esquema de los procesos de interacción entre los envases de alimentos y el entorno.....	117
Figura 15. Esquema de las reacciones de autooxidación. En la iniciación, se forma el radical (R \cdot) a partir de una molécula lipídica insaturada (RH) o un lipohidroperóxido (RO ₂ H) mediante la reacción con un iniciador. Durante la propagación, los radicales libres reaccionan con el oxígeno para formar un hidroperóxido, RO ₂ H y otro radical. El	

proceso finaliza con la reacción entre productos que no están involucrados en la reacción de propagación ²⁵⁷	124
Figura 16. Estructura química de la terbutilhidroquinona (TBHQ, E-319), el hidroxibutilanisol (BHA, E-320) y el butilhidroxitolueno (BHT, E-321)	126
Figura 17. Estructura química de los antioxidantes naturales fenólicos más utilizados, obtenidos a partir de plantas	128
Figura 18. Estructura química del ácido ferúlico en sus dos formas isoméricas	129
Figura 19. Progresión del número de publicaciones que emplean elementos de reconocimiento molecular basados en la tecnología de impronta molecular en el periodo 1989-2017. Base de datos de Web of Science.....	134
Figura 20. Representación esquemática de la síntesis de un MIP	135
Figura 21. Esquema de la síntesis de un MIP para Fmoc-Cys(SH)-OH empleando el modelo de impronta covalente. 1) Generación del complejo covalente entre la molécula plantilla y el monómero funcional, mediante un enlace disulfuro. 2) Adición de la mezcla de prepolimerización. 3) Polimerización. La extracción de la molécula plantilla requiere la ruptura de los enlaces covalentes del complejo, que deberán volver a formarse en la etapa de reconocimiento. Adaptado de la referencia 305.....	138
Figura 22. Esquema de la síntesis de un MIP para enrofloxacino empleando el modelo de impronta no covalente. 1) Generación del complejo entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales, mediante enlaces de hidrógeno. 2) Adición de la mezcla de prepolimerización. 3) Polimerización. Tras la extracción de la molécula plantilla, el reconocimiento tendrá lugar mediante enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Adaptado de la referencia 310	140
Figura 23. Esquema de la síntesis de un MIP para el tripéptido Lys-Trp-Asp empleando el modelo de impronta semicovalente. 1) Generación del complejo entre la molécula plantilla y el monómero funcional, mediante enlaces covalentes. 2) Adición de la mezcla de prepolimerización que contiene otro monómero funcional que se une al complejo, mediante enlaces de hidrógeno. 3) Polimerización. 4) Extracción de la molécula plantilla mediante la ruptura de los enlaces covalentes. Tras la extracción de la molécula plantilla, el reconocimiento tendrá lugar mediante enlaces de hidrógeno. Adaptado de la referencia 314.....	141

Figura 24. Esquema de síntesis de un MIP para Picloram empleando el modelo de impronta mediada por metales. 1) Generación del complejo de coordinación entre el Eu^{3+} , la molécula plantilla y los monómeros funcionales, que actúan como ligandos. 2) Adición de la mezcla de prepolimerización que contiene otro monómero funcional que se une al complejo mediante enlaces de hidrógeno. 3) Polimerización. Tras eliminar la molécula plantilla es necesario regenerar el metal para que se produzca el reconocimiento selectivo. Cuando se completa la coordinación al metal se produce la emisión de fosforescencia. Adaptado de la referencia 319.....	143
Figura 25. Micrografías SEM de: a) MIP sintetizado en forma de bloque, tras su triturado y tamizado, para el reconocimiento del antibiótico enrofloxacino, reproducida con permiso de la referencia 325; b) Monolito MIP que recubre las paredes interiores de una columna cromatográfica para la separación quiral de aminoácidos, reproducida con permiso de la referencia 326	146
Figura 26. Micrografías SEM de MIPs obtenidos mediante polimerización: a) Por precipitación selectiva a enrofloxacino, reproducido con permiso de la referencia 310; b) En suspensión selectiva a Boc-Pro, reproducida con permiso de la referencia 330	148
Figura 27. Micrografías SEM de a) Partículas esféricas sintetizadas mediante hinchamiento por pasos selectivos a coumaclor, reproducida con permiso de la referencia 331; b) Partículas esféricas porosas sintetizadas utilizando un molde sacrificable de sílica selectivas a fluoroquinolonas, reproducida con permiso de la referencia 332; c) Nanofilamentos de MIP, selectivos a enrofloxacino, obtenidos empleando un molde de Al_2O_3 . Reproducida con permiso de la referencia 333	149
Figura 28. Micrografías TEM de partículas núcleo recubrimiento. El núcleo de gel de sílice está dopado con tris(1,10-fenantrolina)rutenio(II) y se recubre de un MIP selectivo a enrofloxacino. Reproducida con permiso de la referencia 335.....	150
Figura 29. Micrografías SEM de MIPs en formato de nanogel: a) Con actividad tipo Aldolasa I sintetizados mediante el uso de agentes RAFT con un tamaño de 20 nm, reproducido con permiso de la referencia 339; b) Selectivos a tripsina sintetizados mediante la impronta en estado sólido con un tamaño de 100 nm, reproducido con permiso de la referencia 300	152

Figura 30. Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida empleando un MIP como adsorbente (MISPE). El procedimiento es análogo al de una SPE convencional. En un cartucho con el MIP empaquetado y acondicionado se siguen los siguientes pasos: 1) Carga de la muestra; 2) Lavado para eliminar interferentes retenidos en el MIP de manera no selectiva; 3) Elución del analito retenido selectivamente; y 4) Regeneración del cartucho MISPE.	158
Figura 31. Esquema del uso de un MIP como catalizador para la síntesis de Chalcona. Tras la incorporación del ion cobalto el polímero: 1) Se incuba con los reactivos de partida, acetofenona y benzaldehído; 2) Tras la formación del complejo de coordinación se produce la enolización y la adición nucleófila formándose un intermedio de reacción; 3) Finalmente se produce la deshidratación obteniéndose el producto final, el cual únicamente tiene un punto de unión con el sitio de reconocimiento, y se extrae del polímero regenerando el centro catalítico. Adaptación de la referencia 381	161
Figura 32. Ejemplo de ensayo competitivo entre una molécula y un análogo marcado con HRP, empleando un pocillo funcionalizado con MIPs	165
Figura 33. Estructura del ácido hidroferúlico (HFA)	305
Figura 34. Perfiles de hinchamiento de los MIHs (izquierda) y NIHs (derecha) sintetizados con HEMA (A), DMAEMA/HEMA (C) y 1-ALPP /HEMA (G) como monómeros funcionales sin porógeno y los respectivos polímeros sintetizados utilizando ACN (D, F y G, respectivamente) (n = 3)	307
Figura 35. Estudio de reconocimiento de los MIHs (negro, i) y NIHs (gris, n) tras su incubación durante 48 h en una disolución de FA en agua, 0.068 mM (n = 3, RSD < 12%). Los códigos de los hidrogeles se muestran en la Tabla 2 (apartado 7.1.5.1.) y en el apartado 8.1.3.1 (n = 3)	309
Figura 36. Curvas de capacidad de carga de MIHs P(DMAEMA-co-HEMA-co-EDMA) (T) con un grosor de 0.5 mm (círculos) y 0.9 mm (triángulos) incubadas en una disolución 4 mM de FA en agua. Los MIHs están indicados en negro y los NIHs en blanco (n = 3)	310
Figura 37. Curvas de calibrado del porcentaje de inhibición frente a la concentración de FA en disolución, medida a 517 nm. En la imagen se muestra la variación de color producida, de violeta a amarillo, al aumentar la concentración de FA en la disolución. El	

tramo inicial se ha ajustado a una línea recta empleando el método de los mínimos cuadrados	312
Figura 38. Perfiles de inhibición en los hidrogeles de composición T, MIHs (azul) y NIHs (rojo), en los diferentes simulantes alimentarios (Tabla 4, n=3). La línea de puntos indica la inhibición debida al material polimérico.....	313
Figura 39. Evolución de la oxidación lipídica representada como valor TBARs en muestras de mantequilla cubiertas por el MIH (negro), NIH (rojo) y sin cubrir (verde) tomando muestras cada dos días (n = 3).....	316
Figura 40. Estructura del furfural, el tiofeno-2-carboxaldehído y el ácido 2-tiofenocarboxílico	318
Figura 41. Imágenes de las membranas poliméricas sintetizadas con ácido 2-tiofenocarboxílico como molécula plantilla tras su incubación con disoluciones de furfural (0 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en EtOH:H ₂ O (20:80, v/v) en presencia de HCl 29 mM durante 1 h. La composición de los MIPs (VE-17 y VE-18) y sus correspondientes NIPs (NVE-19 y NVE-20) se describe en la Tabla 14.....	321
Figura 42. Estructura de los aldehídos volátiles más comunes generados durante el proceso de envejecimiento.....	323
Figura 43. Imágenes de las membranas poliméricas NVE-2 incubadas en presencia de diferentes concentraciones de HMF en EtOH:H ₂ O (20:80, v/v)	323
Figura 44. Evaluación de la respuesta de las membranas sensoras a diferentes concentraciones de furfural (63, 250 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en presencia de 0 (negro), 1.3 (rojo) y 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (verde) de acetaldehído en un medio H ₂ O:EtOH (94.6:5.4, v/v). (n = 3; $\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$)	324
Figura 45. Izquierda, evaluación de la respuesta de las membranas sensoras en los diferentes simulantes alimentarios (Tabla 4) para concentraciones de 0 (amarillo) y 500 (rosa) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural ($\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$). Derecha, imágenes de las membranas poliméricas tras la incubación en las condiciones mencionadas	325
Figura 46. Calibrados obtenidos con el método cromatográfico (HPLC, izquierda) y las membranas sensoras (derecha) para el intervalo de concentraciones 75 - 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural en EtOH 20 % (v/v) (n = 3)	327

Figura 47. A) Representación conjunta de los valores de concentración de furfural estimados mediante HPLC-DAD y las membranas sensoras, así como la incertidumbre de ambos métodos para cada nivel de concentración. B) Elipse que representa el intervalo de confianza conjunto de la ordenada en el origen y la pendiente del ajuste de los resultados. Punto rojo: valores experimentales. Punto negro: valores teóricos. Puesto que los valores teóricos quedan dentro del área delimitada por la figura geométrica, ambos métodos son comparables a un nivel de confianza del 95%.....	327
Figura 48. A) Correlación entre la concentración de furfural en las muestras de cerveza, calculadas mediante el método de adiciones estándar, y los días de almacenamiento. La correlación lineal se confirma mediante el valor de r^2 (0.993). B) Correlación entre la concentración de furfural en las muestras de cerveza, calculadas mediante el método de calibración externa (negro) y de adiciones estándar (blanco), y los días de almacenamiento.....	329
Figura 49. A) Estructura del S2 con la numeración correspondiente a los hidrógenos. B, C, D) Ampliaciones del espectro de ^1H RMN comparando el espectro de S2 (negro) y el espectro de S2 y VIPY (rojo) en DMSO- d_6 . Las señales están numeradas en correspondencia con los protones descritos en A.....	332
Figura 50. Estructura de las micotoxinas modificadas de Alternaria AOH-3-glucosido (AOH3G), AME-3-glucosido (AME3G), AOH-3-sulfato (AOH3S), AME-3-sulfato (AME3S) y de altenueno (ALT) y tentoxina (TEN)	336
Figura 51. Curvas de calibrado obtenidas para AOH, AME, AOH3G, AME3G, AOH3S, AME3S, ALT Y TEN, en zumo (A) y concentrado de tomate (B). Las concentraciones de todas las micotoxinas se encontraban entre 0.05 y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	337
Figura 52. Esquema del método PLE-MISPE-HPLC-FLD para la determinación de AOH y AME.....	340
Figura 53. Curvas de calibrado obtenidas tras enriquecer la muestra con AOH (izda.) y AME (dcha.) y aplicar el método PLE-MISPE-HPLC-FLD. Las fortificaciones se realizaron sobre una muestra de tomate antes de la extracción PLE (rojo), antes del proceso MISPE (verde) y tras el proceso MISPE (negro).....	340
Figura 54. Cromatogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de tomate fortificada con 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de AOH y AME. Las muestras se extrajeron según las	

condiciones de la tabla 1 (apartado 7.4.2.5.), se llevaron a un volumen de 50 mL y se filtraron antes de su inyección en el HPLC-FLD. En marrón se indica el cromatograma de referencia y en verde, ocre y naranja los cromatogramas de las tres muestras fortificadas.....	341
Figura 55. Curvas de calibrado obtenidas tras fortificar con AOH (izda.) y AME (dcha.) una muestra de tomate y aplicar el método PLE-MISPE-HPLC-FLD, añadiendo 100 μ L de MeOH tras la evaporación (rosa). En negro se muestra el calibrado obtenido salpicando los extractos obtenidos tras la extracción de un blanco.....	342
Figura 56. Evaluación del efecto de la concentración de Zn^{2+} en la fase móvil. [TeA]: 0 – 5 μ M ($\lambda_{abs} = 280$ nm, $RSD \leq 5\%$).....	347
Figura 57. Curvas de calibrado obtenidas mediante HPLC-DAD para muestras preparadas en ACN (negro) y extracto de arroz diluido:ACN (3:1, v/v) (rojo). [TeA]: 0 – 6 $mg \cdot L^{-1}$ ($n = 3$; $\lambda_{abs} = 280$ nm, $RSD \leq 5\%$)	347
Figura 58. Intensidad de emisión medida en el lector de placas para una placa filtrante de 96 pocillos a diferentes tiempos de retraso ($n = 3$, $\lambda_{ex} = 337$ nm, $\lambda_{em} = 615$ nm)	349
Figura 59. Curvas de calibrado obtenidas en el lector de placas utilizando los MIPs dopados con Eu en presencia de TeA en ACN utilizando tiempos de integración de 250 (negro), 500 (rojo) y 1000 μ s (verde). Las condiciones de medida se detallan en la Tabla 16. [TeA]: 0 – 10 $mg \cdot L^{-1}$ ($n = 3$, $\lambda_{ex} = 337$ nm, $\lambda_{em} = 615$ nm)	349
Figura 60. Evolución de la pendiente del calibrado obtenida para los MIPs dopados con Eu incubados con TeA (0 – 10 $mg \cdot L^{-1}$) en ACN en función del tiempo transcurrido entre la filtración y la medida ($n = 3$, $\lambda_{ex} = 337$ nm, $\lambda_{em} = 615$ nm).....	350
Figura 61. Esquema de reacción de la formación de nanopartículas de SiO_2 a partir de TEOS en medio agua/EtOH en presencia de NH_3	352
Figura 62. Micrografías SEM (arriba) e histogramas de distribución de tamaños (abajo) de las partículas de SiO_2 sintetizadas. La distribución de tamaños se calculó utilizando el software ImageJ® y tomando 100 partículas por muestra. Los códigos se encuentran recogidos en la Tabla 17	354
Figura 63. Esquema de reacción: (A) silanización de las nanopartículas de SiO_2 con 4-CPC y, (B) síntesis e inmovilización del bromuro ditiobenzoato de magnesio	357

Figura 64. Micrografías de TEM de las partículas SiO ₂ @NIP sintetizadas utilizando (A) 180, (B) 90, (C) 36 y (D) 7.2 mg de SiO ₂ @RAFT.....	359
Figura 65. Espectro FTIR y ampliación (interior) de las partículas SiO ₂ @NIP sintetizadas utilizando 7.2 mg de SiO ₂ @RAFT (negro). En rojo se representa el espectro correspondiente a las partículas SiO ₂ @RAFT de partida	360
Figura 66. Espectros FTIR y micrografías TEM de las partículas SiO ₂ @MIP (A) 8B y (B) 8C (negro). En rojo se representa el espectro de las partículas SiO ₂ @RAFT de partida.....	360
Figura 67. Arriba, estructura de las plantillas utilizadas para la síntesis de los MIPs, NIPs y CIPs. Abajo, esquema de la posible distribución de las moléculas en los sitios de unión de los polímeros en los casos mencionados anteriormente.....	361
Figura 68. Micrografías TEM de las partículas SiO ₂ @MIP/NIP/CIP: (A) 8B y (B) 8C...	362
Figura 69. Respuesta analítica obtenida para las partículas de SiO ₂ @MIP/NIP/CIP 8B y 8C tras la síntesis (negro), tras el lavado con EtOH:HAc (2%, v/v) (rojo), incubadas con EuCl ₃ en medio básico (verde) e incubadas con TeA (50 mg·L ⁻¹ en ACN) en dos ensayos diferentes, A y B (amarillo). (Altura focal 4.8 mm; ganancia 1597).....	363
Figura 70. Estudio de lavado de las partículas SiO ₂ @MIP/NIP/CIP 8B y 8C tras su incubación con TeA (50 mg·L ⁻¹ en ACN) y lavado con 0 mL (negro), 1 mL (rojo), 2 mL (verde) y 3mL (amarillo) de MeOH (Altura focal 4.8 mm; ganancia 1400; n = 3)	364

Tablas

Tabla 1. Contenidos máximos de determinadas micotoxinas en los productos alimenticios establecidos por la Directiva Europea según el reglamento (CE) nº 1881/2006 y sus posteriores modificaciones incluyendo los reglamentos (CE) nº 1126/2007 y (UE) nº 105/2010, 165/2010, 594/2012, 1058/2012 y 212/2014 ⁵³⁻⁵⁹	72
Tabla 2. Resumen de las características analíticas de métodos comerciales desarrollados para la determinación de micotoxinas en matrices alimentarias	90
Tabla 3. Resumen de las características analíticas de métodos descritos en la bibliografía para la determinación de AOH, AME y TeA	92
Tabla 4. Marcadores de frescura y principales productos donde encontrarlos. ^{159,160}	101

Tabla 5. Ecuaciones que relacionan los productos de degradación del ATP para su empleo como marcadores de frescura ^{163,164}	102
Tabla 6. Resumen de las características analíticas de métodos descritos en la bibliografía para la determinación de furfural y HMF	111
Tabla 7. Ejemplos más representativos de envases activos aplicados a fines antioxidantes	127
Tabla 8. Características generales de los MIPs en comparación con los anticuerpos ^{301,302}	137
Tabla 9. Principales modelos de isothermas de adsorción de tipo discreto y de distribución continua.....	156
Tabla 10. Resumen de los cartuchos comerciales basados en MIPs utilizados en aplicaciones MISPE	160
Tabla 11. Resumen de MIPs utilizados para la liberación controlada de sustancias....	162
Tabla 12. Características analíticas de sensores ópticos basados en MIPs	166
Tabla 13. Lista de simulantes alimentarios y asignación general de los mismo a los alimentos de acuerdo con la Directiva Europea en base al reglamento (UE) nº 10/2011 ²³⁹	311
Tabla 14. Composición de los polímeros sintetizados utilizando ácido 2-tiofenocarboxílico (Ác. 2-tiofeno) como molécula plantilla	320
Tabla 15. Concentraciones de furfural en las muestras de cerveza en función del tiempo de almacenamiento	328
Tabla 16. Parámetros optimizados para el análisis de TeA empleando como fase sensora MIPs dopados con Eu. Los polímeros se depositaron sobre placas filtrantes de 96 pocillos y la señal analítica se monitorizó utilizando un lector de placas.....	348
Tabla 17. Composición, condiciones y diámetros de las partículas de SiO ₂ sintetizadas en la presente Tesis Doctoral. El diámetro medio se calculó a partir de las micrografías SEM, con el programa ImageJ® tomando 100 partículas para la representación del histograma de distribución de tamaños	353

ABREVIATURAS

Y SÍMBOLOS

Abreviaturas

1-ALPP	1-Alilpiperazina
3,4-DDH	3,4-didesoxihexosulosa-3-eno
3,4-DDP	3,4-didesoxipentosuleno-3-eno
4-CPC	4-(clorometil)feniltriclorosilano
A o abs	Absorbancia
AACA	Acetil acetoacetato
ABDV	2,2'-Azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo)
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribunucleico
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AFs	Aflatoxinas
Ai	Adenina
AIBN	2-(2-cianopropan-2-ildiazenil)-2-metilpropanonitrilo o azobisisobutironitrilo
ALT	Altenueno
AME	Monometil éter de alternariol
AME3G	AME-3-glucosido
AME3S	AME-3-sulfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ANOVA	Análisis de la varianza
Ao	Adenosina
AOH	Alternariol
AOH3G	AOH-3-glucosido
AOH3S	AOH-3-sulfato
App	Aplicación móvil
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATR	Reflectancia total atenuada
ATX	Altérttoxina
BEHPA	Fosfato de bis(2-etilhexilo)
BHA (E-320)	Hidroxibutilanisol
BHT (E-321)	Butilhidroxitolueno

BLS	Método de mínimos cuadrados bivariados
BR9	Tinte rojo básico 9
BSTFA	<i>N</i> , <i>o</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CC _β	Capacidad de detección
CC _α	Límite de decisión
CCC	Cromatografía en contracorriente
CEC	Electrocromatografía capilar
CF	Factor de conversión
CFU	Unidad formadora de colonias
CIP	Polímero improntado de control
CL	Entrecruzante
CMOS	Semiconductor complementario de óxido metálico
CPA	Ácido ciclopiazónico
d-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva
DAD	Detector de hilera de diodos
DaS	Diluir e inyectar
DCM	Diclorometano
DEAM	Dietil alilmalonato
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMAEMA	Metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DON	Deoxivalenol o vomitoxina
DPPH*	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EAMA	<i>N</i> -(2-aminoetil)metacrilamida
EDMA	Dimetacrilato de etilenglicol
EDX	Espectroscopía dispersiva de rayos X
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase heterogénea
ESI	Ionización por electrospray
Et ₃ N	Trietilamina

EtOH	Etanol
EVOH	Copolímero de etilen-vinil-alcohol
FA	Ácido ferúlico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FI	Isoterma de Freundlich
FLD	Detector de fluorescencia
FM	Monómero funcional
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
Fs	Fumonisin
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
GTE	Extracto de té verde
HAc	Ácido acético
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HFA	Ácido 3-(4-hidroxí-3-metoxifenil)propiónico
HMF	5-hidroximetil-2-furfuraldehído o 5-hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano
HS	Espacio de cabeza
Hx	Hipoxantina
HxR	Inosina
IARC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
ICH	Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos para Uso Humano
IFST	<i>Institute of Food Science & Technology</i>
IMP	Inosin 5'-monofosfato

ISEC o GPC	Cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de permeación en gel
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
JECFA	Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO y la OMS
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
LC	Cromatografía de líquidos
LCL	Nivel mínimo de calibración
LDPE	Polietileno de baja densidad
LED	Diodo emisor de luz
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral
LLE	Extracción líquido-líquido
LMRs o MLR	Límites máximos de residuos (<i>maximun limit of residues</i>)
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LR	Intervalo lineal
LSD	Dietilamida de ácido lisérgico
MAM	Metacrilamida
MCM-41	Sílice mesoporosa (<i>Mobil Composition of Matter N^o. 41</i>)
MDA	Malondialdehído
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MIH	Hidrogel de impronta molecular
MIP	Polímero de impronta molecular
MIPC	Cristal fotónico de impronta molecular
MISPE	Extracción en fase sólida mediante polímeros de impronta molecular
MMC	Calibración en matriz
MS	Espectrometría de masas
MS/MS o MS ⁿ	Espectrometría de masas en tándem
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NIH	Hidrogel no improntado

NIP	Polímero no improntado
NSAIDs	Antinflamatorios no esteroideos
OEt	Etóxido
OMe	Metóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTs	Ocratoxinas
P(1-ALPP- <i>co</i> -HEMA- <i>co</i> -EDMA)	Poli(1-alilpiperazina- <i>co</i> -metacrilato de 2-hidroxietilo- <i>co</i> -dimetacrilato de etilenglicol)
P(DEAM- <i>co</i> -EDMA)	Poli(dietil alilmalonato- <i>co</i> -dimetacrilato de etilenglicol)
P(DMAEMA- <i>co</i> -HEMA- <i>co</i> -EDMA)	Poli(metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo- <i>co</i> -metacrilato de 2-hidroxietilo- <i>co</i> -dimetacrilato de etilenglicol)
P(EAMA- <i>co</i> -MAM- <i>co</i> -EDMA)	Poli(<i>N</i> -(2-aminoetil)metacrilamida- <i>co</i> -metacrilamida- <i>co</i> -dimetacrilato de etilenglicol)
P(HEMA- <i>co</i> -EDMA)	Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo- <i>co</i> -dimetacrilato de etilenglicol)
P(VIPY- <i>co</i> -MAM- <i>co</i> -EDMA)	Poli(4-vinilpiridina <i>co</i> metacrilamida- <i>co</i> -dimetacrilato de etilenglicol)
PAE	Poli(ésteres de anhídrido)
PAH	Hidrocarburo aromático policíclico
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PC	1-prienobarboxialdehído
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Detector de matriz de fotodiodos
PFBHA o PFBOA	<i>O</i> -(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina
pHEMA o P(HEMA)	Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo)
PLE	Extracción con disolventes presurizados
POF	Fibra óptica de plástico
PP	Polipropileno
PSA	Amina primaria-secundaria
PT	Purga y trampa
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVP	Polivinilpirrolidona

PVPP	Polivinilpolipirrolidona
PVPP-WS	Solución de lavado de polivinilpirrolidona
QDs	Puntos cuánticos
QqQ	Triple cuadrupolo
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
R (%)	Recuperación
R _A	Recuperación aparente
RAFT	Transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible
RGB	Rojo, verde y azul
RH	Molécula lipídica insaturada
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMS_{bias}	Media cuadrática del sesgo
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>ribonucleic acid</i>)
RO ₂ H	Hidroperóxido
RRT _s	Tiempos de retención relativos
RSD	Desviación estándar relativa
RSD _r	Repetitividad (Precisión intradía)
RSD _R	Reproducibilidad (Precisión intermedia)
S2	3,8,9-trihidroxí-6 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,d</i>]piran-6-ona o Urolithin C
SBSE	Extracción por sorción sobre barra agitadora
SD	Desviación estándar
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SIDA	Ensayo de dilución isotópica estable
SLE	Extracción sólido-líquido
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
SRM o MRM	Monitorización selectiva de reacciones o monitorización múltiple de reacciones
T	Plantilla
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARs	Sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico
TBHQ (E-319)	Terbutilhidroquinona

TCA	Ácido tricloroacético
TeA	Ácido tenuazónico
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEN	Tentoxina
TEOS	Tetraortosilicato
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
TFA	Ácido trifluoroacético
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TTC	Umbral de preocupación toxicológica
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficacia
UV	Ultravioleta
VA	4-vinilanilina
VIPY	4-vinilpiridina
VIS	Visible
WLSLR	Regresión lineal de mínimos cuadrados ponderados
XPS	Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X
ZOL	Zearalenol
ZON	Zearalenona

Símbolos

a	Factor prexponencial que indica el número de sitios de unión y la afinidad media de la red
B	Fracción de analito unida a un polímero
D _k	Permeabilidad al oxígeno
D _w	Coefficiente de difusión del agua
F	Fracción libre de analito en disolución
h	Espesor medio del hidrogel
K	Constante de asociación

\bar{K}_{K1-K2}	Afinidad media ponderada aparente
m/z	Relación masa/carga
N	Número de sitios de unión
\bar{N}_{K1-K2}	Número aparente de sitios de unión
$n o m$	Parámetro de heterogeneidad
\emptyset	Diámetro
Q	Grado de hinchamiento
R^2	Coefficiente de regresión
S/N	Relación señal/ruido
S_{bias}	Precisión del sesgo
T	Temperatura
U	Incertidumbre expandida
$U[C_{ref}]$	Incertidumbre asociada a la pureza de los patrones
$[w_i]$	Factor de ponderación
w_0	Peso del hidrogel seco
w_t	Peso del hidrogel tras ser sumergido en agua durante un tiempo t
w_∞	Peso del hidrogel tras ser sumergido en agua al final del experimento

Notas de estilo

1. Con objeto de homogenizar el criterio de nomenclatura a lo largo de la presente Tesis Doctoral, los decimales no serán indicados con comas, sino con puntos.
2. Las referencias bibliográficas, gestionadas con el programa EndNote (v. X8.2, Thomson Reuters), se muestran en formato de la revista *Chemical Science*, de la *Royal Society of Chemistry*.
3. Aunque los artículos han sido adaptados al formato de texto de la Tesis Doctoral, la numeración de Figuras, Tablas y Ecuaciones, así como las referencias bibliográficas es exclusiva de cada publicación de forma individual. Por motivos de *copyright* de las editoriales, que únicamente permiten la reproducción íntegra del contenido de cada artículo sin su modificación total o parcial, no ha sido posible numerar dichos elementos de forma consecutiva y homogénea respecto a los apartados de Introducción y Discusión integradora. Los permisos excluyen de estas condiciones a los elementos publicados, de acceso gratuito, en los materiales suplementarios respectivos. Por ello, se incluye esta sección, en el caso pertinente, como una extensión de dichos artículos. Así, si un trabajo concluye, por ejemplo, en la Figura 7, el primer elemento del material suplementario, en vez de ser numerado como Figura S1, se incluye como Figura 8.

SUMMARY



Development of selective polymeric materials for quality control and food safety

Food and food products must meet minimum safety standards to be acceptable for human consumption. The direct relationship between food and health has led to the establishment of fundamental consumer rights in terms of food safety. Nowadays, food safety is ensured, among other factors, by setting standards for food quality as well as those that affect different production, processing, storage, transport and sale. The General Food Law Regulation establishes the principle of risk analysis in relation to food and feed and the structures and mechanisms for the scientific and technical evaluations, which are undertaken by the European Food Safety Authority (EFSA). Food law is based on three interrelated components of risk analysis namely, risk assessment, risk management and risk communication.¹

In 2003, the European Union (EU) introduced the European food safety policy aiming to protect human health and consumers' interests, and to foster the smooth operation of the European single market.² This policy includes a series of general provisions focused on the establishment of standards to guarantee: the hygiene of foodstuffs, compliance with phyto- and zoosanitary measures and the prevention of the risks of contamination by external substances, such as mycotoxins. In this context, science is guiding legislative action on different policy aspects that may have an impact on food safety (e.g., maximum limits or prohibition of residues of pesticides, antibiotics, hormones, micro-organisms or mycotoxins). The legal significance of this task depends to a large extent on the analytical procedures used to determine and quantify the objective parameters and data that describe the quality and freshness of food. Food safety assessment specifically requires rapid, sensitive and robust analytical techniques, free of interference from background food components. Thus, materials with high selectivity for sample pretreatment or "in situ" monitoring are in high demand and therefore, their development is one of the main areas of research in the field of analytical chemistry.

Polymeric materials can be applied in a wide variety of areas related to food chemistry, e.g. food packaging, sensing or even in the development of selective sorbents for the analytical separation of residues of contaminants in food. Molecularly imprinted polymers (MIPs) are synthetic antibody mimics that selectively recognize molecular targets. Over the past decade, MIPs have raised increasing attention towards replacing biomolecules as selective recognition elements in sensors and other applications such as analytical separations. MIPs are highly robust, showing excellent operational stability under a wide variety of conditions. They can be used in organic or in aqueous media and their cost is lower and their preparation is easier than that of antibodies, avoiding the use of laboratory animals or the difficulties associated to the production of antibodies for toxic compounds. Non-imprinted polymeric materials bearing reactive groups for interacting with the target compound have also been broadly applied to the development of optical sensors.

The present work describes the development of selective polymeric materials for their application in the development of optical sensors for the analysis of furfural, a beer freshness marker, or for the determination of tenuazonic acid (TeA), a mycotoxin produced by *Alternaria* fungi, as sorbents for the fabrication of solid phase extraction cartridges selective to alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME), also produced by *Alternaria* or; for the implementation of natural antioxidant food packaging materials with controlled release properties. This work also aims to demonstrate the applicability of MIPs in the field of food safety and quality assurance and control.

The first paper (Food Chemistry, 2016, **190**, 487-494) describes the synthesis of molecularly imprinted hydrogels (MIHs) loaded with ferulic acid (FA), a natural oxidant, and their application as controlled release packaging in butter cans. This technology provides continuous release of the antioxidant from the packaging material to the food surface, thus maintaining a critical concentration that inhibits lipid oxidation and improves food quality during storage. Two different functional monomers namely 1-allylpiperazine (1-ALPP) or 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate (DMAEMA), were tested for hydrogel synthesis in combination with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as a diluent monomer and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as a cross-linker. A synthetic surrogate of FA, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propionic acid (HFA), was

synthesized and applied as template molecule in the synthesis of the MIH. The 1-ALLP/HEMA-based polymers exhibited the highest imprinting effect while the DMAEMA/HEMA-based MIHs showed the most significant FA loading capacity. Thus, the latter were selected to assess the antioxidant capacity of the material. During cold storage, FA-loaded MIHs prevented up to 25% more oxidation than the material without FA and almost a 50% more than those samples without protection, potentially extending the shelf life of butter cans.

The second paper (Analytical Chemistry 2016, **88**, 3959-3966) reports the development of disposable optical sensors for the colorimetric analysis of furfural, a freshness indicator, in beer using a smartphone-based reader. The sensing mechanism was based on the Stenhouse reaction in which aniline and furfural react in acidic media with the formation of a deep red cyanine derivative. The sensing films were based on P(HEMA) hydrogels and include 4-vinyl aniline as furfural-sensitive indicator monomer. The colorimetric response ($\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$), visible to the naked eye, was monitored using either a portable fiber-optic spectrophotometer or the built-in camera of a smartphone. Under optimum conditions, a linear response to furfural in beer was obtained in the 39 to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ range, with a detection limit of 12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The sensing films are highly selective to furfural and no cross-reactivity was observed from other volatile compounds generated during beer aging. The method was applied to the determination of furfural in ale beers with different storage times at room temperature. A linear correlation ($r^2 > 0.991$) between the storage time and furfural concentration in the beer samples was confirmed and the results were validated by HPLC with diode-array detection.

The third and fourth papers focused on the analysis of two *Alternaria* mycotoxins, alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME), using MIPs as solid phase extraction (SPE) sorbents. The third one (Food Chemistry, 2018, **243**, 357-364) describes the synthesis of MIPs selective to both mycotoxins based on 4-vinyl pyridine (VIPY) and methacrylamide (MAM) as functional monomers, EDMA as a cross-linker and 3,8,9-trihydroxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one (S2) as an AOH surrogate template. A molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) method was optimized for the selective isolation of the mycotoxins from aqueous samples coupled to HPLC with

fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 258 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) or MS/MS analysis. The MISPE method was validated by UPLC – MS/MS for the determination of AOH and AME in tomato juice and sesame oil based on European Commission Decision 2002/657/EC. Method performance was satisfactory with recoveries from 92.5% to 106.2% and limits of quantification within the $1.1 - 2.8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ range in both samples. One of the limitations of the optimized approach was the extraction of the mycotoxins from complex food matrices prior to MISPE selective clean-up and preconcentration.

In order to overcome this drawback and avoid the use of conventional extraction techniques with low recovery rates, the fourth paper (Food Additives and Contaminants Part A, 2018, in press) dealt with the optimization of a pressurized liquid extraction (PLE) method for the extraction of AOH and AME from tomato samples. This technique combines high pressures and moderate temperatures to enhance analyte solubility and mass transfer kinetics yielding increased extraction recoveries. Moreover, it is operationally very simple, automatic and environmentally friendly as it requires low consumption of organic solvents and reduced extraction times compared with traditional extraction methods. Optimal extraction conditions were achieved by using MeOH/water (25:75, *v/v*) at 70°C as extraction solvent, a pressure of 1000 psi and a single extraction cycle. The resulting PLE extracts were cleaned and preconcentrated by MISPE using the P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA) MIP optimized in the previous work, and analyzed by HPLC-FLD. The optimized method was used to determine AOH and AME in fortified tomato samples with recoveries of 67–97%. The detection limit for AOH and AME was 7 and $15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The ensuing PLE–MISPE–HPLC–FLD method was validated for the analysis of both mycotoxins in tomato samples in agreement with European Commission Decision 2002/657/EC.

The last paper (Molecularly imprinted polymer-based sensor containing europium (III) ions for tenuazonic acid determination in food samples, manuscript in preparation) reports the synthesis of MIPs doped with a Eu (III) complex and aqua-labile ligands, that upon coordination to tenuazonic acid (TeA), another *Alternaria* mycotoxin, yield an increase in Eu (III) typical luminescence at 615 nm. The fact that the complex shows a maximum absorption at 276 nm (284 nm when complexed to Eu (III)), led us to consider the possibility of using TeA as an antenna ligand for Eu (III) luminescence

sensitization. Several functional monomers, namely diethyl allylmalonate (DEAM) and allyl acetoacetate (AACA), were tested at different ratios to determine the optimal composition of the MIP using EDMA as a cross-linker. The sensing beads allowed the luminescent determination of TeA in ACN with a LOD of $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and a linear response in the range of $2.6 - 20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. No cross-reactivity was observed in the presence of other mycotoxins such as alternariol, β -zearalenol and cyclopiazonic acid, usually present in the contaminated samples. The developed sensor was applied to the analysis of TeA in fortified rice extracts and the method was validated by HPLC-DAD.

RESUMEN



Desarrollo de materiales poliméricos selectivos para el control de la calidad y la seguridad alimentaria

Los alimentos y los productos alimenticios deben cumplir unas normas mínimas de seguridad para su empleo en el consumo humano. La relación directa entre alimentación y salud ha dado lugar al establecimiento de los derechos fundamentales de los consumidores en materia de seguridad alimentaria. Hoy en día, la inocuidad o seguridad alimentaria se garantiza, entre otros factores, mediante el establecimiento de estándares de calidad de los alimentos, así como de aquellos que afectan a las diferentes etapas de producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y venta. El Reglamento Sobre Legislación Alimentaria General establece el principio del análisis de riesgos en relación con los alimentos y los piensos, y establece las estructuras y mecanismos para las evaluaciones científicas y técnicas que realiza la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). La legislación alimentaria se basa en tres componentes interrelacionados del análisis de riesgos, que incluyen la evaluación, la gestión y la comunicación de los mismos.¹

En 2003, la Unión Europea (UE) introdujo la política europea de seguridad alimentaria destinada a proteger la salud humana y los intereses de los consumidores, así como a fomentar el buen funcionamiento del mercado único europeo.² Esta política incluye una serie de disposiciones generales centradas en el establecimiento de normas para garantizar: la higiene de los productos alimenticios, el cumplimiento de las medidas fitosanitarias y zoonosanitarias y la prevención de los riesgos de contaminación por sustancias externas, como las micotoxinas. En este contexto, la acción legislativa se está centrando en diferentes aspectos, por ejemplo, el establecimiento de límites máximos o la prohibición de la presencia de residuos de plaguicidas, antibióticos, hormonas, microorganismos o micotoxinas, que pueden tener un impacto en la inocuidad de los alimentos. La importancia jurídica de esta tarea depende, en gran medida, de los procedimientos analíticos disponibles para determinar y cuantificar estos parámetros, así como disponer de datos objetivos para valorar la calidad y la frescura de los alimentos. Se requieren por ello técnicas analíticas rápidas, sensibles y robustas que permitan controlar la composición del alimento sin importar la complejidad de la matriz

investigada. En este sentido, la síntesis de materiales de reconocimiento selectivo para su aplicación en el pretratamiento de muestras o para el desarrollo de sensores es una de las principales áreas de investigación en el campo de la química analítica.

Los materiales poliméricos pueden emplearse en una amplia variedad de aplicaciones relacionadas con la química de los alimentos, por ejemplo para el envasado de los mismos, en la detección de compuestos o, incluso, en el desarrollo de adsorbentes selectivos para el análisis de residuos de contaminantes. Los polímeros de impronta molecular (MIPs) son materiales sintéticos que reconocen selectivamente a un determinado analito o a una familia de compuestos, mimetizando el comportamiento de los anticuerpos sintéticos que reconocen selectivamente dianas moleculares. Durante las últimas décadas, los MIPs han atraído la atención de los investigadores por sus excelentes características para sustituir a las biomoléculas como elementos de reconocimiento selectivo en sensores y otras aplicaciones, especialmente en separaciones analíticas. Los MIPs son altamente robustos, mostrando una excelente estabilidad operacional bajo una amplia variedad de condiciones. Pueden utilizarse en medios orgánicos o acuosos, su coste es menor y su preparación es más fácil que la de los anticuerpos, evitando el uso de animales de laboratorio o las dificultades asociadas a la producción de anticuerpos para compuestos tóxicos. Los materiales poliméricos sin impronta que contienen grupos reactivos para interactuar con el compuesto objetivo también se han aplicado ampliamente en el desarrollo de sensores ópticos.

Esta Tesis Doctoral describe el desarrollo de materiales poliméricos selectivos para su aplicación en el desarrollo de sensores ópticos para el análisis de furfural, un marcador de frescura de cerveza, o para la determinación de ácido tenuazónico (TeA), una micotoxina producida por los hongos del género *Alternaria*. También se han sintetizado MIPs para su empleo como adsorbentes selectivos en cartuchos de extracción en fase sólida para la determinación de otras dos micotoxinas producidas por *Alternaria*, concretamente, alternariol (AOH) y monometil éter de alternariol (AME). Finalmente, se ha demostrado la aplicación de los MIPs como materiales activos de envasado para la liberación controlada de antioxidantes.

El primer trabajo (Food Chemistry, 2016, **190**, 487-494) describe la síntesis de hidrogeles de impronta molecular (MIHs) cargados con ácido ferúlico (FA), un antioxidante natural, y su aplicación como envases de liberación controlada para prolongar el tiempo de vida útil de mantequillas envasadas. La tecnología desarrollada permite la liberación continua del antioxidante a partir del MIP sobre la superficie del alimento, manteniendo así una concentración crítica que inhibe la oxidación de los lípidos y mejora la calidad de los alimentos durante el almacenamiento. Para la síntesis del polímero se investigaron dos monómeros funcionales diferentes, 1-alilpiperazina (1-ALPP) y metacrilato 2-(dimetilamino)etilo (DMAEMA), en combinación con metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) como monómero diluyente y dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) como entrecruzante. Se sintetizó un sustituto sintético del FA, el ácido 3-(4-hidroxí-3-metoxifenil)propiónico (HFA), para su empleo como molécula plantilla en la preparación de los MIHs. Los polímeros basados en 1-ALPP/HEMA demostraron mayor efecto de impronta, mientras que los MIHs basados en DMAEMA/HEMA presentaron mayor capacidad de carga para el FA. Por todo ello, se seleccionaron estos últimos para la síntesis de los hidrogeles, evaluándose la capacidad antioxidante de estos materiales en mantequillas. Durante el almacenamiento en frío, la oxidación de la mantequilla envasada con MIHs cargados con FA fue un 25% inferior a la observada en presencia de los correspondientes NIHs y, prácticamente, un 50% menor que en las latas sin protección. Esta aplicación demuestra la utilidad de los MIHs para la preparación de envases activos para prolongar de la vida útil de los alimentos.

El segundo trabajo (Analytical Chemistry 2016, **88**, 3959-3966) describe el desarrollo de sensores ópticos desechables para el análisis colorimétrico de furfural, un indicador de frescura en cerveza, utilizando como detector un teléfono inteligente. El mecanismo de medida se basa en la reacción de Stenhouse en la que la anilina y el furfural reaccionan en medio ácido originando un derivado de cianina de color rojo intenso. Las membranas sensoras se sintetizaron empleando 4-vinilanilina como monómero indicador sensible al furfural y metacrilato de 2-hidroxietilo como monómero diluyente. La respuesta colorimétrica ($\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$), visible a simple vista, se midió utilizando un espectrofotómetro portátil de fibra óptica o la cámara incorporada en un teléfono inteligente. Una vez optimizadas las condiciones de medida

se obtuvo una respuesta lineal al furfural en cerveza en el intervalo de 39 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, con un límite de detección de 12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las membranas sensoras presentaban una gran selectividad al furfural y no se observó reactividad cruzada frente a otros compuestos volátiles generados durante el envejecimiento de la cerveza. El método se aplicó a la determinación de furfural en cervezas *ale* almacenadas durante diferentes periodos de tiempo a temperatura ambiente. Se confirmó la existencia de una correlación lineal ($r^2 > 0.991$) entre el tiempo de almacenamiento y la concentración de furfural en las muestras de cerveza y los resultados fueron validados mediante HPLC con detección de hilera de diodos.

El tercer y cuarto trabajo se centraron en el análisis de dos micotoxinas de *Alternaria*, alternariol (AOH) y su monometil éter (AME), utilizando MIPs como adsorbentes de extracción en fase sólida (SPE). El tercer trabajo (Food Chemistry, 2018, **243**, 357-364) describe la síntesis de un MIP selectivo a ambas micotoxinas basado en 4-vinil piridina (VIPY) y metacrilamida (MAM) como monómeros funcionales, EDMA como entrecruzante y 3,8,9-trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-ona (S2) como molécula plantilla, estructuralmente relacionada con el AOH. Se optimizó un método de extracción en fase sólida empleando MIPs (MISPE) para la retención selectiva de las micotoxinas en muestras de alimentos. El análisis se llevó a cabo empleando HPLC con un detector de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 258 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) o MS/MS. El método MISPE para la determinación de AOH y AME en zumo de tomate y aceite de sésamo se validó mediante UPLC - MS/MS de acuerdo a las bases de la Decisión 2002/657/CE de la Comisión Europea. El rendimiento del método fue satisfactorio con recuperaciones del 92.5% al 106.2% y límites de cuantificación en el intervalo de 1.1 – 2.8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, para ambas muestras. Una de las limitaciones de la aproximación optimizada fue la extracción de las micotoxinas a partir matrices complejas de alimentos antes de la etapa de preconcentración utilizando MISPE.

Con el fin de superar este inconveniente y evitar el uso de técnicas de extracción convencionales con bajos rendimientos de recuperación, el cuarto trabajo (Food Additives and Contaminants Part A, 2018, en prensa) se centró en la optimización de un método empleando la técnica de extracción disolventes presurizados (PLE) para la extracción de AOH y AME a partir de muestras de tomate triturado. Esta técnica

combina altas presiones y temperaturas moderadas para mejorar la solubilidad del analito y la cinética de transferencia de masa, lo que aumenta el rendimiento de extracción. Además, su funcionamiento es muy sencillo, automático y respetuoso con el medio ambiente, ya que requiere un bajo consumo de disolventes orgánicos y tiempos de extracción reducidos, en comparación con los métodos de extracción tradicionales. Las condiciones óptimas de extracción se lograron utilizando MeOH/agua (25:75, *v/v*) a 70 °C como disolvente de extracción, una presión de 1000 psi y un solo ciclo de extracción. Los extractos de PLE resultantes se limpiaron y preconcentraron mediante MISPE, utilizando el MIP sintetizado con P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA) descrito en el trabajo anterior, y se analizaron utilizando HPLC-FLD. El método optimizado se utilizó para determinar la AOH y la AME en muestras de tomate enriquecido logrando recuperaciones en el intervalo del 84 – 97% (RSD < 8%, *n* = 6) para AOH y de 67 – 91% (RSD < 13%, *n* = 6) para AME. El límite de detección para AOH y AME fue de 7 y 15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente. El método PLE-MISPE-HPLC-FLD desarrollado se validó para el análisis de ambas micotoxinas en muestras de tomate contaminadas con las micotoxinas, de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE de la Comisión Europea.

El último trabajo (Molecularly imprinted polymer-based sensor containing europium (III) ions for tenuazonic acid determination in food samples, manuscrito en preparación) describe el desarrollo de un sensor óptico para la determinación de ácido tenuazónico en muestras de alimentos empleando un MIP luminiscente como elemento de reconocimiento selectivo. El principio de medida se basa en la formación de un complejo fosforescente de Eu (III) con los monómeros funcionales empleados en la síntesis del MIP y el ácido tenuazónico. La micotoxina se emplea como ligando antena y el complejo formado presenta una intensa emisión a 615 nm. Se han evaluado varios monómeros funcionales a diferentes concentraciones, tales como el alilmalonato de dietilo (DEAM) y el acetoacetato de alilo (AACA), para determinar la composición óptima del MIP, utilizando EDMA como entrecruzante. Las partículas sintetizadas permitieron la determinación de TeA en ACN con un LOD de $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y una respuesta lineal en el intervalo de $2.6 - 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. No se observó reactividad cruzada frente a otras micotoxinas como alternariol, β -zearalenol y ácido ciclopiazónico, generalmente presentes en las muestras contaminadas. El sensor desarrollado se aplicó al análisis de

TeA en extractos de arroz enriquecido con la micotoxina y el método fue validado mediante HPLC-DAD.

INTRODUCCIÓN

5.1. Micotoxinas en alimentos

Etimológicamente, la palabra micotoxina proviene de la palabra griega *mukos* (hongo) y la palabra latina *toxicum* (veneno). De forma general estos compuestos se pueden definir como metabolitos secundarios, habitualmente de bajo peso molecular, producidos por hongos que contaminan alimentos, especialmente cereales y hortalizas, durante su cultivo, recogida o almacenaje.³

En la década de los 80 del siglo pasado, se incluyeron en este grupo “productos naturales producidos por hongos que generan una respuesta tóxica cuando son introducidos en bajas concentraciones a vertebrados superiores y otros animales por una ruta natural”.⁴ Más tarde se introdujo el concepto de metabolito secundario y se definieron las micotoxinas como “productos o intermedios metabólicos, encontrados como un producto de diferenciación en grupos taxonómicos restringidos, no esenciales en el crecimiento ni en la vida de los organismos que los producen, y biosintetizados a partir de uno o más metabolitos mediante una variedad de rutas más amplia que las disponibles en el metabolismo general”. Este término se ha aplicado más tarde a otros productos tóxicos naturales generados por hongos.⁵

No se conoce exactamente el rol biológico de estos metabolitos secundarios en la vida del hongo. Su producción se suele dar, mayoritariamente, al final de la fase de crecimiento o durante la fase estacionaria del ciclo vital del hongo. En términos generales, se ha observado que estas moléculas ayudan a la supervivencia del organismo y, en ocasiones, de su huésped. No obstante, no se ha podido comprobar este hecho con absoluta certeza y aún se está estudiando la función de estos compuestos, más allá de tratarse de productos de desecho del ciclo biológico de los hongos.⁶

Aunque estas toxinas tienen estructuras y efectos muy diferentes y provienen de especies distintas, se suelen agrupar en un mismo grupo debido a que pueden causar enfermedades y muerte en los seres humanos y tienen un origen relativamente común. De hecho, en ocasiones, diferentes micotoxinas pueden tener efectos semejantes e, incluso, sinérgicos en organismos vivos.⁷

5.1.1. Importancia e interés de las micotoxinas

Como se ha comentado anteriormente, las micotoxinas pueden tener efectos negativos, agudos o crónicos, sobre la salud de los seres humanos. Además, también suponen un indudable impacto negativo sobre la economía debido, entre otros, a los gastos derivados de los tratamientos médicos o a las pérdidas producidas por la contaminación de los cultivos.

Los efectos de las micotoxinas se pueden trazar durante más de dos milenios, cuando se comenzó a almacenar el grano para su posterior consumo. Si bien se desconocía el origen del problema, existen diversos escritos que describen los efectos de alcaloides ergóticos en Asia y Europa desde el 700 a. C. hasta la Edad Media. Otra de las referencias históricas es el llamado “Fuego de San Antonio” producido por la ingesta de cereales contaminados por alcaloides ergóticos. Más recientemente, durante la segunda guerra mundial se produjeron cientos de muertes en la Unión Soviética debido al síndrome hemorrágico producido por la toxina T-2 que contaminaba los cereales. Finalmente, el término micotoxina se empleó por primera vez en 1960, tras la muerte de más de 100.000 pavos en Gran Bretaña debido a la ingesta de harina de cacahuete contaminada con aflatoxina B1.⁸

Como muestra este breve desarrollo histórico, las enfermedades y los problemas derivados de la presencia y el consumo de micotoxinas en alimentos son diversos. Se ha comprobado que la ingesta de elevadas concentraciones de estas toxinas en la dieta puede provocar graves problemas crónicos y agudos en la salud tanto humana como animal, afectando a diferentes órganos. Si bien se considera que el riesgo de contaminación aguda por micotoxinas es bajo en comparación con otros contaminantes, no ocurre lo mismo cuando el organismo está sometido a una exposición crónica debido a la severidad de las lesiones que provocan, lo que convierte a las micotoxinas en los contaminantes conocidos con mayor riesgo tóxico.⁹

De forma general, la intoxicación por micotoxinas se conoce como micotoxicosis y, en algunas ocasiones, sus efectos pueden originar la muerte de los individuos afectados por dicha enfermedad.¹⁰ Como se ha mencionado anteriormente, la intoxicación aguda es muy reducida, pues requiere el consumo de cantidades elevadas

de la micotoxina en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, la micotoxicosis de tipo crónico requiere exposiciones prolongadas a bajas concentraciones, siendo lo más habitual, y sus efectos son generalmente irreversibles.¹¹ Por lo general, las micotoxinas no se pueden identificar a simple vista. Así, los consumidores pueden pensar que, una vez eliminada la parte del alimento en la que se encuentra el hongo, se elimina el riesgo. Sin embargo, esto es incorrecto ya que las micotoxinas pueden estar distribuidas por todo el alimento, aunque éste aparente estar sano. Por otra parte, la ingesta continuada a bajas concentraciones de estos contaminantes naturales puede tener un efecto acumulativo en los seres vivos.

Las micotoxinas pueden aparecer en alimentos que se procesan antes de su consumo, lo que permite minimizar su presencia. No obstante, en muchas ocasiones no se eliminan completamente en las etapas de procesado, apareciendo en los productos finales. Este es el caso de las semillas y los cereales en los que, tras la limpieza de la cáscara, se eliminan gran parte de las micotoxinas contaminantes. La molienda suele diluir su concentración y, aunque estos productos se utilicen como alimento animal, siguen suponiendo un problema para la salud humana, ya que pueden aparecer en los productos derivados del ganado. Por lo general, aquellos procesos que requieren una elevada temperatura, bien sea por cocinado o por extrusión, permiten reducir el número de micotoxinas presentes en el alimento, aunque existen ciertas toxinas resistentes a estos procedimientos y otras que tras su degradación generan otros compuestos de menor toxicidad que los originales, pero que siguen siendo dañinos. Es por ello que, aunque se ingieran alimentos procesados, es necesario controlar la presencia de estos compuestos en los productos que llegan al consumidor.¹²

Por lo general el estudio de los efectos de las micotoxinas se realiza de manera individual, es decir, considerando la acción de una única toxina. Sin embargo, un mismo alimento puede contener varias micotoxinas, bien porque las produce el mismo hongo o diferentes especies. Es por ello que, en los últimos años, se ha discutido si evaluar los efectos de las micotoxinas de manera aislada resulta o no significativo, ya que pueden tener efectos sinérgicos entre sí, incrementándose su toxicidad sobre los seres humanos o los animales. Desafortunadamente, los estudios de toxicidad por acción simultánea de más de una micotoxina se realizan con menor frecuencia que los individuales.¹³

Actualmente se conocen unas 400 micotoxinas, aunque la atención se ha centrado principalmente en aquellas con carácter cancerígeno o tóxico para los seres humanos. Algunos estudios han calculado que entre el 25 – 50% de los cultivos mundiales están contaminados por estas toxinas.¹⁴ Los alimentos de consumo humano pueden contaminarse en diferentes etapas de la cadena alimentaria por factores tan diversos como: el consumo directo de cereales o plantas contaminadas, el consumo de productos animales o, incluso, por la contaminación derivada del polvo o el aire que transporta hongos y/o micotoxinas. El consumo de éstas y sus efectos adversos sobre la salud humana son un problema de interés mundial, aunque más común en países en vías de desarrollo. En los países desarrollados se realizan inversiones importantes para evitar la presencia estos contaminantes en los alimentos, estableciéndose sistemas de control y vigilancia que permiten minimizar la exposición de los consumidores a estos tóxicos. No obstante, en los países menos industrializados el consumo suele ser propio, lo que provoca un mayor riesgo de ingesta, y cualquier tipo de contaminación tiene un efecto mucho más drástico en cuanto a pérdidas económicas se refiere. Además, mientras que los productos de buena calidad son exportados una vez superados los controles de calidad, especialmente en términos de contaminantes alimentarios, los remanentes quedan en el comercio local, incrementando los riesgos de intoxicación. No obstante, no se trata de un problema exclusivo de los países en vías de desarrollo y el hecho de que exista un incremento en el número de enfermedades provocadas por las micotoxinas hace necesario redoblar los esfuerzos realizados por los organismos oficiales para detectar su presencia y eliminarlas de los alimentos.⁸

5.1.2. Clasificación de las micotoxinas

Debido a las diferentes estructuras químicas, a la variedad de su origen biosintético, a los distintos efectos biológicos que producen o a la diversidad de las especies de hongos que las generan, la clasificación de las micotoxinas no es única y varía de un área de conocimiento a otro. Así, en medicina se clasifican en función de la enfermedad que provocan o de los órganos a los que afectan; en química orgánica, en función a su estructura química; en bioquímica, según su origen biosintético; en biología, en grupos genéricos; y en micología en función del hongo productor. No obstante, ninguna de estas clasificaciones resulta totalmente satisfactoria.⁷

Una de las clasificaciones más utilizadas consiste en catalogar a las micotoxinas basándose en el género de hongo productor. Los más importantes son *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*.¹⁵ Sin embargo, en ocasiones es difícil clasificar a las micotoxinas atendiendo a este criterio, ya que pueden producirlas hongos de géneros diferentes. Por esta razón, en la presente Tesis Doctoral se han clasificado por grupos teniendo en cuenta su estructura química, salvo en el caso de las micotoxinas de la familia de la *Alternaria* y las micotoxinas emergentes, que requieren una consideración especial debido a sus características. Esta clasificación es una de las más utilizadas cuando se trata de destacar las propiedades y características comunes de estos compuestos.^{7-9,13} A continuación se describen los grupos de micotoxinas más representativos, incluyendo los estudiados en la presente Tesis Doctoral.

5.1.2.1. Alcaloides ergóticos

Los alcaloides ergóticos son micotoxinas que despiertan gran interés y que tienen gran relevancia histórica. Se producen, principalmente, en hongos de la especie *Claviceps* aunque también aparecen en algunas especies de *Neotyphodium*, *Aspergillus* y *Penicillium*.¹³ Los cultivos más afectados son los pertenecientes a la familia de las gramíneas, incluyendo cultivos de gran importancia como centeno, trigo, arroz, maíz, cebada, mijo o avena. De hecho, más de 400 especies vegetales producidas en Europa están contaminadas con *Claviceps purpurea*, produciendo la enfermedad conocida como ergotismo.¹⁶

Su estructura incluye un sistema de anillos tetracíclicos derivados de la ergolina (Figura 1A). El ácido lisérgico, aislado por primera vez en 1934, es la estructura común a todos los alcaloides ergóticos. Se pueden clasificar en tres grandes grupos: las clavinas, con una estructura básica de ergolina pero sin componentes peptídicos; los alcaloides del ácido lisérgico, incluyendo la ergotamina (Figura 1B); y la ergina que es la amida del ácido lisérgico.⁷

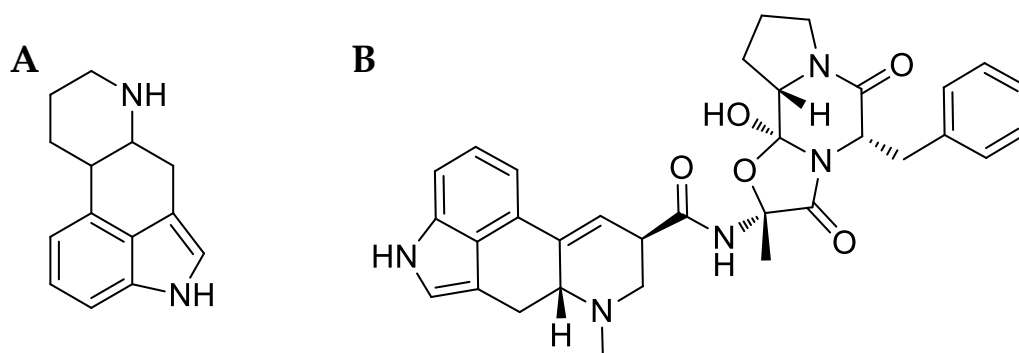


Figura 1. A) Sistema de anillos tetracíclicos derivado de la ergolina. B) Estructura química de la ergotamina.

Este grupo incluye algunas de las toxinas más conocidas desde la antigüedad. Si bien no se conocía la causa, desde los primeros escritos en Mesopotamia hasta el “Fuego de San Antonio”, nombre que le daban al ergotismo en la Edad Media, o la obtención del LSD como droga, pasando por sus usos como medicamento, existen diferentes evidencias históricas relacionadas con la contaminación de los alimentos con alcaloides ergóticos.¹⁷ Estas micotoxinas tienen un potente efecto vasoconstrictor, pudiendo causar gangrena, y pueden afectar tanto al sistema gástrico como al sistema nervioso central. Sin embargo, las técnicas utilizadas en la actualidad para la limpieza y molienda de los granos han permitido reducir prácticamente a cero la contaminación por estas toxinas. Además, se trata de compuestos termolábiles por lo que suelen destruirse durante el horneado y el cocinado.⁸

5.1.2.2. Aflatoxinas

El grupo de las aflatoxinas (AFs) incluye algunas de las micotoxinas de mayor toxicidad. Derivan de los policétidos y son producidas por especies del tipo *Aspergillus* principalmente, *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Estos hongos suelen afectar, mayoritariamente, a los cultivos de cereales como trigo, maíz, algodón, nueces, cacahuetes y otros frutos secos, causando graves daños en la salud de personas y animales, incluyendo hepatotoxicidad, teratogenicidad e inmunotoxicidad.¹⁸

El grupo de las AFs comprende 20 compuestos con una estructura policíclica característica de los compuestos tipo furano-cumarina. Entre ellas las mayoritarias son las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Figura 2). El número “2” indica la pérdida de un doble enlace comparado con su isómero “1”. La letra hace referencia a los colores azul (B, del inglés *blue*) y verde (G del inglés *green*) de la fluorescencia que emiten al ser expuestos a

la luz ultravioleta (UV), y a su movilidad relativa en cromatografía.¹³ Dentro de este grupo es necesario incluir las AFM₁ y AFM₂. Se trata de metabolitos hidroxilados que aparecen en la leche de los mamíferos tras haber consumido alimentos contaminados con AFB₁ y AFB₂, respectivamente, siendo el primero el más frecuente en el mundo.¹⁹

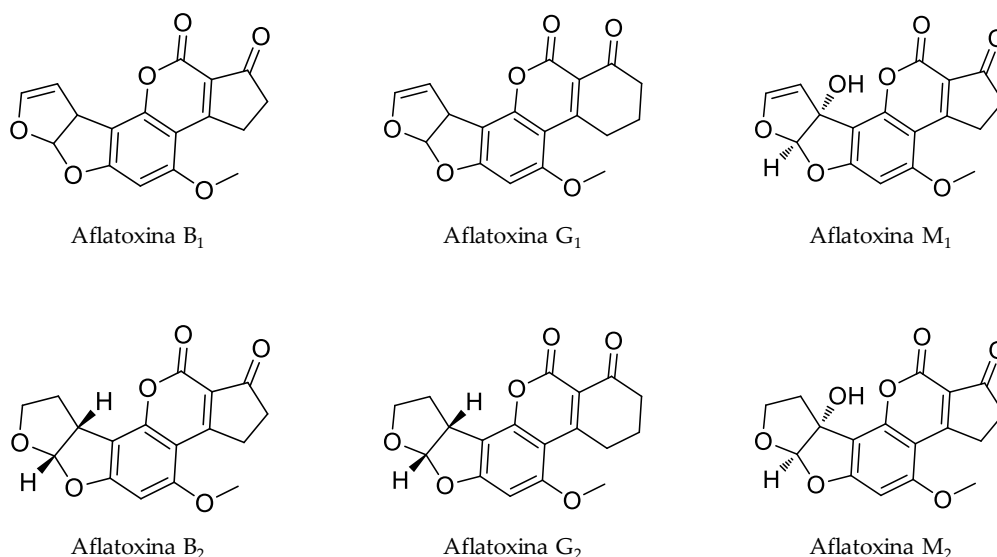


Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂.

Su proliferación está favorecida por climas secos durante la maduración del alimento, una alta humedad durante la cosecha y un inadecuado secado y almacenamiento. Además, las mayores fuentes de exposición son el maíz y las semillas, que siendo los más susceptibles de contaminación también son los más consumidos.²⁰ Existe un gran interés en el análisis de estas micotoxinas debido a sus implicaciones sanitarias y a las pérdidas generadas con importantes consecuencias económicas. El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) ha clasificado a las aflatoxinas entre los cancerígenos naturales más potentes que se conocen. Debido a ello se aplican unos límites de tolerancia muy bajos en alimentos, aunque éstos varían en función del país.²¹

5.1.2.3. Citrinina

La citrinina es un compuesto derivado del fenol, aislado por primera vez en 1931 del *Penicillium citrinum* tras generar la conocida como “toxicosis del arroz amarillo” en Japón.²² Posteriormente se descubrió que también la producían otras especies de *Penicillium* como *P. camemberti*; de *Aspergillus* como *A. terreus*, *A. niveus* y *A. oryzae*; y de

Monascus como *M. ruber* and *M. purpureus*. La mayoría de estos hongos se utilizan para la producción de alimentos. Por ejemplo, el *A. oryzae* se utiliza para fabricación de miso, sake y salsa de soja⁸ y los hongos del género *Monascus* se utilizan como colorantes rojos y en productos destinados a rebajar el colesterol dado que producen estatinas. Es por ello que su uso en alimentación hace que sea necesario un mayor control de la presencia de citrinina en estos productos y que su eliminación, durante y tras la fermentación, sea una tarea prioritaria en cuanto a salud, economía y medio ambiente se refiere.²³

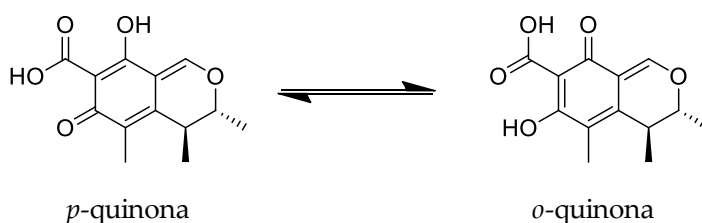


Figura 3. Estructura química de la citrinina en sus dos formas tautoméricas.

La citrinina es un derivado del benzopirano con un grupo ácido carboxílico (Figura 3). Se trata de cristales amarillos que presentan un máximo de emisión de fluorescencia a 333 nm. Su estructura de quinona presenta dos enlaces de hidrógeno intramoleculares así como dos formas tautoméricas. Además, tiene una gran afinidad para complejarse con metales y se degrada fácilmente a altas temperaturas,²⁴ tanto en atmósfera seca como húmeda, dando lugar a derivados que, en principio, deberían ser menos tóxicos (Figura 4). Sin embargo, existe un estudio que demuestra que, al menos, la citrinina H1 presenta una citotoxicidad superior a la del compuesto de partida. Es por ello que se ha replanteado el uso de tratamientos térmicos para la eliminación de estas toxinas en los alimentos.^{25,26}

Se suele encontrar en granos de cereales y productos derivados de los mismos, legumbres, frutas, zumos, especias, aceitunas, algunos quesos y arroz de levadura rojo, como se comentó anteriormente.

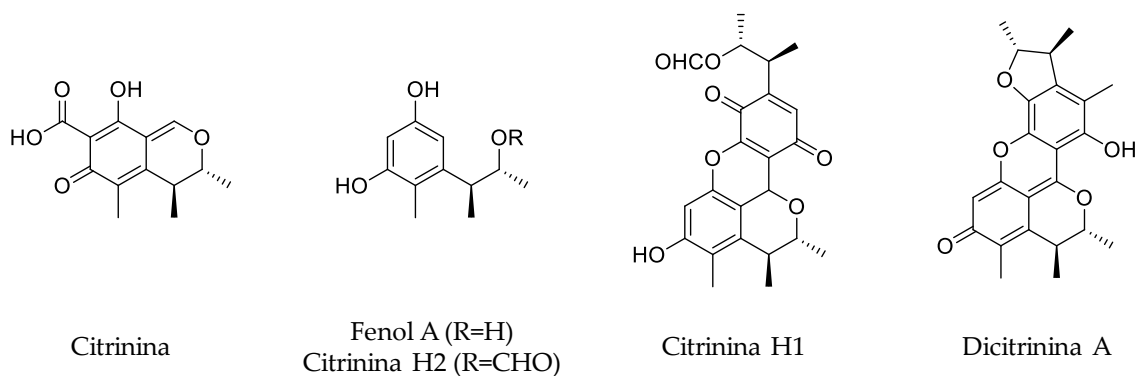


Figura 4. Estructura química de la citrinina y sus derivados (fenol A, citrinina H2, citrinina H1 y dicitrinina A) generados tras someter a la micotoxina a diversos tratamientos térmicos.²⁶

Por lo general, suele aparecer debido a una contaminación producida tras la cosecha y en muchos casos aparece a la vez que la ocratoxina A.²⁷ De hecho, ambas micotoxinas se han analizado de manera simultánea ya que se ha demostrado el efecto sinérgico entre ellas.^{28,29} La citrinina es una potente nefrotoxina e inmunotoxina y se sospecha que puede tener carácter cancerígeno y teratogénico, no obstante las evidencias disponibles hasta la fecha son todavía escasas.³⁰

5.1.2.4. Fumonisin

Descritas por primera vez en 1988, las fumonisinas son cadenas alifáticas de 20 átomos de carbono con dos cadenas hidrofílicas laterales unidas mediante enlace tipo éster. Esta estructura es muy similar a la de la esfingosina, un fosfolípido esencial de las membranas celulares.¹¹ Se aisló por primera vez del *Fusarium verticilloides* pero también la producen otros hongos de esta especie, entre los que destacan *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. globosum*.³¹

Se han logrado aislar e identificar 18 tipos diferentes de fumonisinas, que difieren principalmente en los grupos hidroxilo (Figura 5). Se clasifican en cuatro series: A, B, C y P. La fumonisina más tóxica y predominante es la fumonisina B₁ (FB₁) que junto a la FB₂ constituyen, aproximadamente, el 70% de las fumonisinas encontradas en la naturaleza y en los alimentos.³²

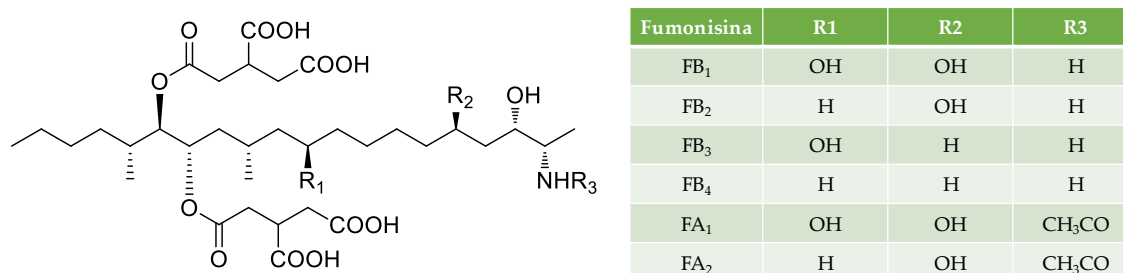


Figura 5. Estructura química de las fumonisinas.³²

El maíz es el alimento más afectado por este grupo de micotoxinas, siendo muy frecuente encontrar *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en dicho cereal. También es posible hallarlas, aunque de manera menos frecuente, en otros alimentos como sorgo, espárragos, arroz, cerveza y judías. El clima cálido, la acción de los insectos y el estrés térmico pueden tener un importante papel en la aparición de estas micotoxinas. Los granos deben recogerse con cuidado de no dañarlos y manteniendo un nivel de humedad inferior al 14% para evitar el crecimiento del hongo. Las fumonisinas se forman antes de la cosecha o en las primeras etapas de secado, por lo que su concentración no aumenta durante la etapa de almacenamiento, salvo en condiciones extremas.²⁰

Como se mencionó anteriormente, las fumonisinas presentan una gran similitud con la esfingosina y este hecho, según algunos investigadores, parece ser la causa de su toxicidad debido a la competencia en el metabolismo de esfingolípidos. La inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos puede causar serios problemas relacionados con la actividad celular, ya que son componentes esenciales de la membrana celular que interviene en diferentes funciones.¹¹ Además, causan la leucoencefalomalacia (síndrome del agujero en la cabeza) en caballos y conejos, edemas pulmonares en cerdos y presentan efectos hepatotóxicos y cancerígenos en hígados de rata. En humanos existe una importante relación con el cáncer esofágico.⁷

5.1.2.5. Ocratoxinas

Las ocratoxinas (OTs) son producidas principalmente por los hongos *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. crysogenum* y *P. nordicum*) en regiones templadas, y *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. section Nigri*, *A. carbonarius* y *A. awamori*) en regiones tropicales y subtropicales.³²

Químicamente están formadas por una isocumarina y una fenilalanina unidas por un enlace amida. En la naturaleza es posible encontrar las ocratoxinas A (OTA), B (OTB) y C (OTC); donde la OTB no está clorada y la OTC es el éster etílico de la OTA (Figura 6).¹³ Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados hacen referencia a la OTA por ser la más tóxica, aunque la aparición simultánea de las tres puede dar lugar a efectos tóxicos sinérgicos tal y como ocurre con la citrinina.³⁰

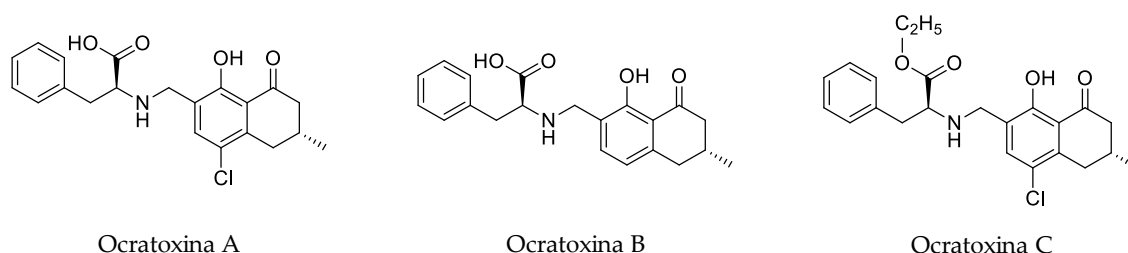


Figura 6. Estructura química de las ocratoxinas A, B y C.

La OTA se puede encontrar en diferentes tipos de alimentos como cereales, nueces, frutas, vino, cerveza, licores, especias, carne, leche, café y alimentos infantiles. La contaminación es muy variable y depende de las condiciones de temperatura y humedad, antes y después de la cosecha.¹³ Uno de los grandes problemas de la OTA es su elevada estabilidad térmica, ya que no se destruye mediante los procedimientos habituales de preparación de alimentos. Son necesarias temperaturas de al menos 250 °C, durante varios minutos, para reducir la concentración de OTA en dichos alimentos.³³

Se ha observado que la OTA es tóxica y puede resultar cancerígena en los humanos.³⁴ Su principal diana es el riñón, siendo un potente cancerígeno renal en diversas especies animales. Otros efectos adversos son la inmunotoxicidad y un aumento en la peroxidación lipídica. Se sospecha que puede ser la causante de varias nefropatías humanas incluyendo la nefropatía endémica de los Balcanes y la nefropatía intestinal crónica.

La OTA tiene un efecto inhibitorio sobre las enzimas que utilizan fenilalanina como sustrato, debido a la presencia de dicho grupo en su estructura, en especial sobre la Phe-tRNA sintetasa, lo que provoca una inhibición de la síntesis de proteínas. Además, es un veneno mitocondrial, ya que daña este orgánulo celular e interfiere en la fosforilación oxidativa, aparte de incrementar la apoptosis en diversos tipos de células.³⁵

5.1.2.6. Patulina

La patulina (Figura 7) es un policétido producido por al menos 60 especies diferentes de hongos entre los que destacan *Penicillium expansum*, *P. leucopus*, *P. patulum*, *P. urticae*, *P. griseofulvum*, *P. crustosum* y *A. Clavatus*, siendo la primera la especie productora más común.³⁶ En un principio se aisló como antibiótico y, al proceder de diversas especies, tuvo nombres diferentes tales como clavacina, expansina, claviformina, clavatina y miocina C. Sin embargo, diversos estudios demostraron que si bien tenía efectos antimicrobianos, antivirales y antiprotozoarios también resultaba tóxica y por ello se clasificó finalmente como micotoxina.⁹

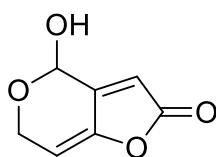


Figura 7. Estructura química de la patulina.

La patulina se considera una de las micotoxinas más peligrosas en frutas, especialmente manzanas, peras y sus productos. De hecho, se utiliza como marcador de calidad en zumos y concentrados de manzana. El hongo *P. expansum* es el productor de patulina más eficiente y causa una enfermedad denominada “podredumbre azul”, que afecta a manzanas, cerezas, peras y otras frutas. Por lo general, esta toxina aparece en bebidas y productos derivados sin fermentación o poco fermentados (mostos pasteurizados, sidras achampanadas, aperitivos elaborados con mostos frescos), cuando se han empleado en su producción frutas dañadas, de mala calidad o podridas. Sin embargo, no aparece en bebidas alcohólicas totalmente fermentadas o en los vinagres, ya que sobrevive a la pasteurización pero no a los procesos de fermentación alcohólica de los mostos, siendo metabolizada por las levaduras.⁸

La patulina tiene gran afinidad por los grupos sulfhidrilo, lo que explica su poder inhibidor en muchas enzimas. Puede alterar el sistema inmune modificando las respuestas hipersensibles y disminuyendo la concentración de inmunoglobulinas en suero.³⁵ Aunque su carácter tumorigénico se descubrió hace más de un siglo, no se ha clasificado como carcinogénica en seres humanos debido a la falta de evidencias. Por otro lado, sí se ha comprobado su genotoxicidad, mutagenicidad y su citotoxicidad. No

obstante, es necesario realizar nuevos estudios para evaluar los riesgos de exposición a esta micotoxina.³⁷

5.1.2.7. Micotoxinas del género *Alternaria*

Consideradas como micotoxinas emergentes, debido a la falta de legislación que controle su presencia en alimentos, se producen en hongos del género *Alternaria* y se corresponden con un grupo de compuestos muy estudiados en la actualidad. El principal productor es la especie *Alternaria alternata*, pero también las generan *A. arborescens*, *A. brassicae*, *A. mali*, *A. porri* y *A. tenuissima*, por citar algunas.³⁸

Se han aislado más de 30 productos potencialmente tóxicos producidos por el género *Alternaria*, sin embargo, solo unos pocos se han caracterizado químicamente. Las toxinas más importantes son el alternariol (AOH), el monometil éter del alternariol (AME), el altenueno (ALT), las altertoxinas I, II y III (ATX-I, -II, -III), la tentoxina (TEN) y el ácido tenuazónico (TeA) (Figura 8). Estas toxinas se pueden dividir en tres grupos:³⁹

- Dibenzopironas: AOH, AME, ALT.
- Perilenos: ALT-I, -II, -III.
- Ácidos tetrámicos: TeA.

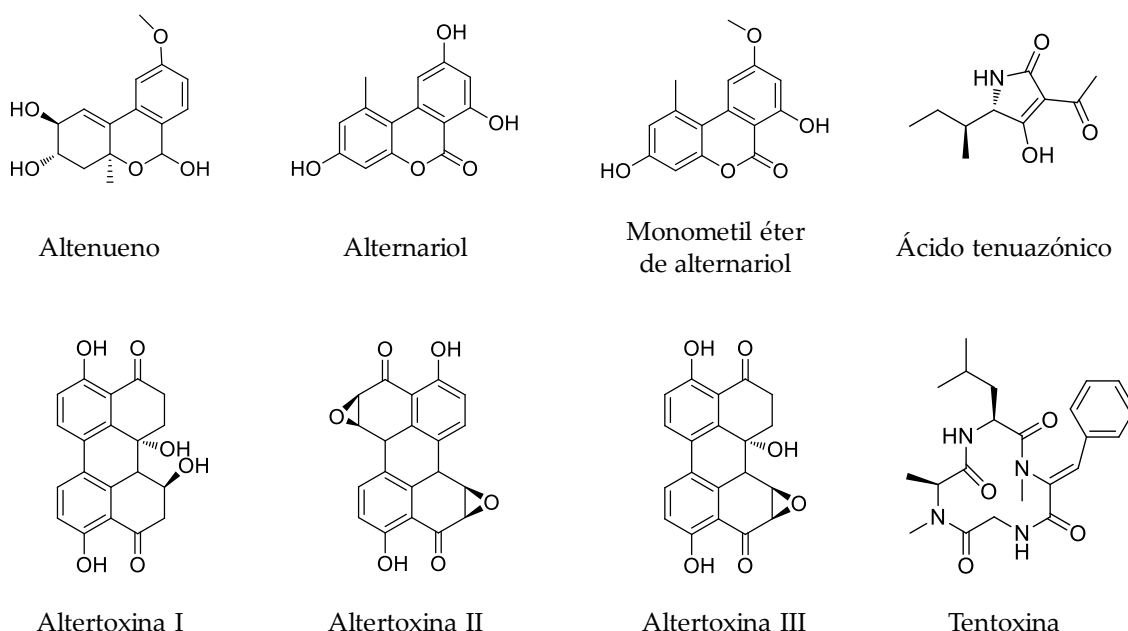


Figura 8. Estructura química del altenueno, alternariol, monometil éter de alternariol, altertoxinas I, II y III, tentoxina y ácido tenuazónico.

Es posible encontrar hongos de *Alternaria* por todo el mundo y en diversos tipos de alimentos como tomates, manzanas, patatas, cereales, cítricos o semillas de girasol. Además, también se ha observado que pueden infectar materiales en descomposición, como la madera podrida.⁴⁰

De acuerdo con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), de todas las micotoxinas producidas por el género *Alternaria* las más importantes son AOH, AME, TeA, TEN y ALT.⁴¹ A continuación se describen algunas características relevantes de estos compuestos.

El AOH se suele encontrar en frutas y vegetales, así como en productos procesados como zumos y vinos. Se ha detectado en un 31% de los alimentos y cultivos en Europa, encontrándose los mayores niveles en legumbres, nueces y aceites de origen vegetal.⁴² AOH y AME suelen encontrarse en los mismos alimentos, tanto antes como después de la cosecha, aunque no se tiene mucha información sobre la presencia natural de ambos en los mismos. No obstante, se han detectado en productos comercializados a concentraciones en el intervalo de 1 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Actualmente se sigue estudiando el efecto que tienen estas toxinas sobre la salud humana y animal. Si bien ni el AOH ni el AME presentan una toxicidad aguda, se ha demostrado que ambos compuestos son mutagénicos y clastogénicos, mostrando el AOH mayor genotoxicidad que el AME.⁴³ Además, se han publicado otros efectos adversos para la salud humana relacionados con estas dos micotoxinas, tales como su actuación como antagonistas de la topoisomerasa o la ruptura de las cadenas de ADN por parte de AME.⁴⁴

El TeA es otra de las micotoxinas producidas en mayor concentración por los hongos del género *Alternaria*, aunque también puede tener su origen en los hongos *Poma sorghina*, *Pyricularia oryzae* y *Magnaporthe oryzae*.⁴⁵ Se puede encontrar en productos derivados del tomate, productos de panadería, zumos, aceites vegetales y semillas de girasol. Recientemente se han encontrado los niveles más altos de TeA en cereales de sorgo y alimentos infantiles que contenían mijo o sorgo.⁴⁶ En comparación con el resto de micotoxinas del género *Alternaria*, es la que tiene una mayor toxicidad con propiedades cancerígenas, citotóxicas y fitotóxicas.⁴⁷ Se considera un potente inhibidor de la biosíntesis de proteínas y presenta toxicidad aguda en los mamíferos. En humanos

se cree que puede ser el responsable de la enfermedad llamada “onylai”, un desorden hemorrágico causado por la ingesta de cereales infectados por el hongo *Poma*. Cabe resaltar que, por lo general, la presencia de TeA se relaciona con una contaminación por *Alternaria*, pero algunos estudios también lo relacionan con la presencia de *P. sorghina*. Es por ello que es necesario empezar a prestar atención a los alimentos contaminados también con este hongo.⁴⁵

5.1.2.8. Tricotecenos

El grupo de los tricotecenos comprende unos 200 metabolitos producidos por más de 350 especies de hongos entre los que destacan las especies de *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichotecium* y *Verticimonosporium*. Se caracterizan por su bajo peso molecular y comparten un esqueleto tetracíclico con un grupo epóxido, responsable de su actividad toxicológica. El término tricoteceno proviene de la tricotecina, el primer miembro identificado dentro de este grupo.⁸ Estas micotoxinas se pueden encontrar en todo tipo de cultivos a lo largo del mundo como cereales y vegetales, entre otros.

Se clasifican en macrocíclicos y no macrocíclicos, dependiendo de la presencia de un éster macrocíclico o un puente diéster entre los carbonos 4 y 15. El grupo de los no macrocíclicos puede dividirse a su vez en dos grupos: tipo A, con un hidrógeno o una cadena tipo éster en la posición C8, y tipo B, con una cetona en dicha posición. Dentro del tipo A se engloban las toxinas T-2, HT-2, neosolaniol y diacetoxicirpenol; mientras que en el grupo B se encuentran el deoxivalenol (o vomitoxina), el nivalenol y el fusarenon-x. Los hongos del género *Fusarium* son los que producen más tricotocenos no macrocíclicos.⁷ Los principales tricotocenos son el deoxivalenol (DON), la toxina T-2 y la toxina HT-2 (Figura 9).

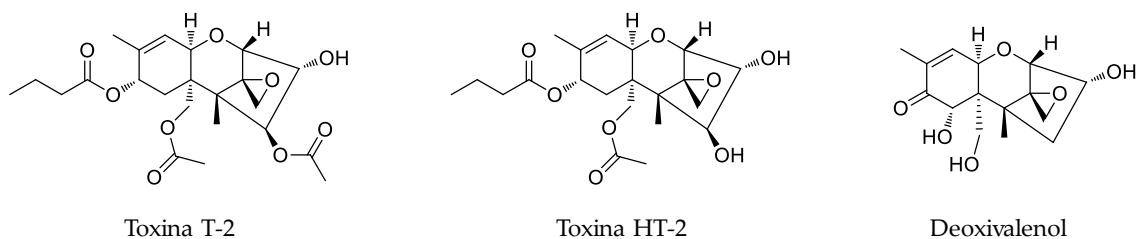


Figura 9. Estructura química de las toxinas T-2 y HT-2 y del deoxivalenol

La toxina T-2 es la más tóxica de los tricotocenos. Su metabolito, la HT-2, formado a partir de una reacción de desacetilación producida en la mayoría de los microorganismos, presenta una toxicidad similar, y suelen aparecer juntas. La exposición a estos compuestos se asocia a diversas patologías como irritación de la piel, problemas gastrointestinales o hipotrofia del bazo y el timo. Los efectos predominantes para la salud humana son la inhibición de la síntesis de proteínas y la apoptosis de las células, aunque no se ha observado ningún efecto genotóxico o directamente mutagénico.³⁷

El DON es menos tóxico que la mayoría de los tricotocenos, pero es el más prevalente y el que se encuentra con mayor facilidad en los cultivos de cereales. Presenta una elevada estabilidad y sobrevive a la mayoría de las etapas de procesado. Sin embargo, aún no se conocen, ni entienden correctamente los efectos del DON sobre la salud humana.⁸ No se ha clasificado hasta el momento como agente cancerígeno debido a la falta de investigación en humanos, aunque los últimos estudios sugieren que su exposición crónica es un factor de riesgo.³⁷

Cabe mencionar que últimamente se ha prestado mucha atención a los tricotocenos producidos por *Stachybotrys chartarum*. Sus metabolitos presentan una elevada toxicidad, por ejemplo, se ha demostrado que la satratoxina G es más tóxica que la T-2. Por otro lado, se ha publicado la asociación entre este hongo y enfermedades que pueden llegar a ser mortales por lo que, considerando que aparece fácilmente en materiales húmedos como madera, paredes pintadas o conductos de ventilación, también es necesario el estudio de estas micotoxinas.⁸

5.1.2.9. Zearalenona y derivados

La zearalenona (ZON) es una micotoxina producida por distintas especies de *Fusarium*, en especial por *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* y *F. incarnatum*. Generalmente estos hongos crecen e invaden los cultivos en condiciones de frío y humedad durante la floración, pero el crecimiento y la producción de toxinas puede darse también tras la cosecha si las condiciones de almacenamiento no son adecuadas. La micotoxina es estable hasta 150 °C y su degradación solo se ha observado a muy altas temperaturas o en condiciones básicas. Esta especie también produce

metabolitos siendo el α -zearalenol (α -ZOL) y el β -zearalenol (β -ZOL) los derivados más importantes (Figura 10).³⁵

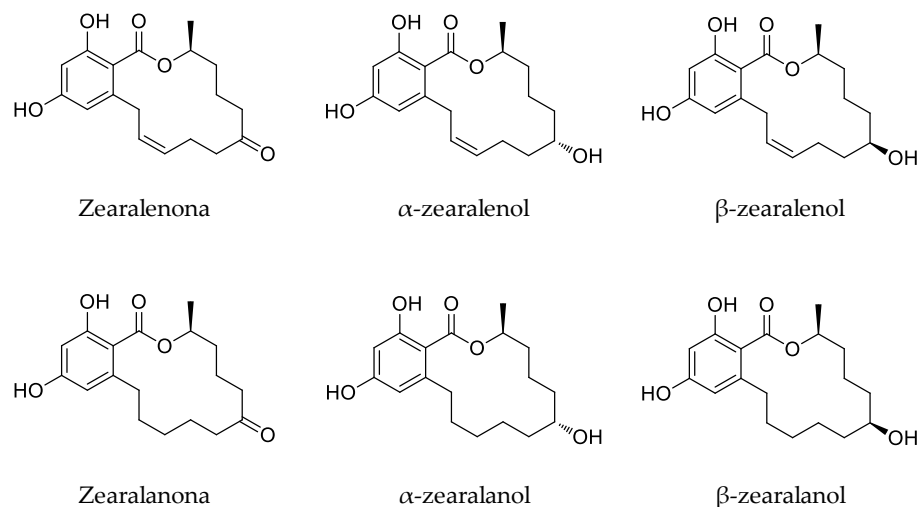


Figura 10. Estructura química de la zearalenona y sus derivados (α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanona, α -zearalanol, β -zearalanol).

Estas micotoxinas suelen encontrarse en los cultivos cereales de todo el mundo. Si bien el maíz es el cereal con un mayor riesgo de contaminación, también se han detectado en trigo, cebada, avena, sorgo, centeno, arroz y productos de soja. Su presencia también se ha descrito en alimentos de origen animal, tales como leche, huevos o carne, presumiblemente tras la ingestión de vegetales contaminados.³⁹

La zearalenona y sus derivados comparten una estructura similar a la hormona 17β -estradiol y, por tanto, una afinidad similar en los receptores estrógenos, originando problemas de fertilidad y hormonales tanto en humanos como en el ganado.³⁷ De hecho, aunque todas presentan capacidad estrogénica, el potencial del α -ZOL es superior al de ZON y β -ZOL, probablemente debido a la gran afinidad de esta molécula por los receptores de estrógenos. Hasta el momento no se ha clasificado como cancerígena y, aunque se considera que su bioacumulación es nula, es necesario realizar estudios sobre los riesgos que supone para la salud su aparición simultánea con otras micotoxinas.³⁵

5.1.2.10. Micotoxinas emergentes

En los apartados anteriores se han descrito las micotoxinas que han recibido mayor atención a lo largo de los años, bien sea por su toxicidad o por su presencia habitual en una gran variedad de alimentos de consumo general. No obstante, existen

otras micotoxinas denominadas “emergentes” sobre las que todavía hay poca información, en algunos casos debido a su descubrimiento más recientemente y a su tardía clasificación como micotoxinas. Las micotoxinas emergentes se pueden definir como “aquellas que no se determinan rutinariamente ni están legisladas y, sin embargo, la evidencia de su incidencia está aumentando rápidamente”.⁴⁸ En este apartado se describen, brevemente, las más destacadas teniendo en cuenta la frecuencia con la que se encuentran en los alimentos, su concentración y el interés científico que despiertan: moniliformina, beauvericina, ácido fusárico y ácido micofenólico (Figura 11).

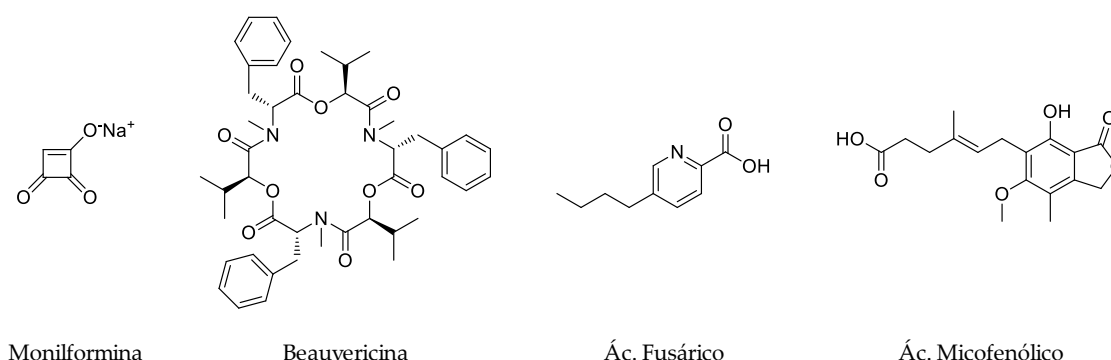


Figura 11. Estructura química de la moniliformina, beauvericina, ácido fusárico y ácido micofenólico.

La moniliformina se aisló por primera vez en 1971 a partir del *F. verticiloides*. También la producen otras especies de *Fusarium* como *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. Es un inhibidor de diversas enzimas como la piruvato deshidrogenasa, interrumpiendo el proceso de gluconeogénesis; la glutatión peroxidasa y la reductasa.³⁵ Se ha localizado en países de todo el mundo siendo los cultivos de cereales, en especial maíz y trigo, los más contaminados por esta micotoxina.⁴⁸

La beauvericina se produce en diversas especies de *Fusarium* como *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioide*s o *F. oxysporum*. Esta micotoxina es un ionóforo, es decir, transporta cationes mono- o divalentes (*p.e.* K^+ o Ca^{2+}) a través de la membrana afectando a la concentración fisiológica de estos iones. La información toxicológica de esta micotoxina aún es insuficiente, aunque se está evaluando su citotoxicidad y frecuencia de aparición en productos animales. Se ha encontrado beauvericina en productos derivados de cereales, así como en cereales y hierbas medicinales en China.^{35,48}

Otra micotoxina producida por los hongos del género *Fusarium* es el ácido Fusárico. Las especies que lo producen son *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. crookwellense*, *F. napiforme* y *F. fujikuroi*. Esta micotoxina tiene ciertas propiedades farmacológicas, aunque solo en dosis moderadamente altas, y posee un poder sinérgico con otras toxinas como DON o FB₁. Se han descrito efectos negativos asociados a su presencia como la inhibición de ATP o citotoxicidad en ciertas células, aunque también se han realizado estudios clínicos aplicándola para el tratamiento de enfermedades como el cáncer o la hipertensión. Sin embargo, el hecho de que no se conozca correctamente el mecanismo de acción y que tenga un efecto sinérgico con otras micotoxinas hace necesario un mayor estudio de la misma.^{48,49}

El ácido micofenólico (Figura 11) fue aislado por primera vez en 1893 a partir de *Penicillium brevicompactum*, aunque también puede ser producido por *P. roqueforti*, *P. carneum* o *Byssosclamyces nivea* (productor además de patulina). A pesar de ser considerado una micotoxina, su toxicidad es muy baja y, de hecho, es utilizado como inmunosupresor en tratamientos posteriores a un trasplante o como antirreumático. Es posible encontrarlo en alimentos como jamón curado, quesos fermentados o vino. Puesto que a las concentraciones a las que se encuentra no es tóxico y están por debajo de la ventana terapéutica, su presencia en los alimentos no se considera un problema. Es por ello que no debería incluirse dentro del grupo de las micotoxinas al no presentar efectos tóxicos para la salud de humanos y animales.⁴⁸

5.1.3. Legislación

Aunque los riesgos para la salud asociados al consumo de micotoxinas son elevados, es imposible prohibir el consumo de productos relacionados con la presencia de dichos contaminantes, ya que aparecen de manera natural y en muchos casos incontrolada. Es por ello, que las autoridades de los distintos países han promulgado límites máximos de residuos (LMRs) de micotoxinas en distintos alimentos con el fin de garantizar una protección eficaz de la salud pública. Para respetar estos niveles es necesario mantener unas buenas prácticas que aseguren el correcto cultivo, cosecha, almacenamiento y procesamiento de los alimentos de interés. Dado que estas micotoxinas están presentes en todo el mundo, prácticamente todos los países han legislado su

presencia en distintos alimentos, aunque los valores establecidos no son siempre equivalentes. A continuación, se detallan, de forma cronológica, las diferentes normativas publicadas en la Unión Europea en lo que respecta a legislación y LMRs de micotoxinas en alimentos.

A partir del reglamento (CEE) nº 315/93 *por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios*,⁵⁰ la Comunidad Europea publicó el reglamento (CEE) nº 194/97 *por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*.⁵¹ En este primer reglamento solo se establecieron límites para nitratos en ciertos alimentos pero se hizo una llamada a elaborar una lista con los posibles contaminantes con los límites en los distintos alimentos y el límite de detección de los mismos.

Tras diversas modificaciones, el anterior reglamento se derogó a favor del reglamento (CE) nº 466/2001.⁵² En este reglamento se buscaba unificar los contenidos máximos de contaminantes en determinados alimentos de manera que se eliminasen las disparidades entre los estados miembros. Se establecieron los primeros límites para micotoxinas, en concreto para aflatoxinas en cacahuetes, cereales y leche; diferenciando alimentos procesados o para consumo directo. En este caso se establecieron diferentes niveles para AFB₁, para la suma de AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂ y para AFM₁.

En la actualidad está vigente en la Unión Europea el reglamento (CE) nº 1881/2006.⁵³ Este reglamento se estableció considerando las diversas modificaciones que se habían realizado del reglamento anterior. En él se modificaron los contenidos máximos de determinados contaminantes a fin de tener en cuenta la nueva información y la evolución del *Codex Alimentarius*. Se adoptaron dictámenes basándose en los nuevos progresos científicos y en las nuevas directivas que se habían ido promulgando, principalmente en el caso de las micotoxinas. En concreto se establecieron contenidos máximos para aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, deoxivalenol, zearalenona, fumonisinas y toxinas T-2 y HT-2. Posteriormente se han publicado diversas modificaciones sobre este reglamento, entre las que se destacan las siguientes por hacer alusión a las micotoxinas:

- Reglamento (CE) nº 1126/2007 en lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium* en el maíz y los productos del maíz.⁵⁴
- Reglamento (UE) nº 105/2010 en lo que se refiere a la ocratoxina A.⁵⁵
- Reglamento (UE) nº 165/2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el contenido máximo en los productos alimenticios.⁵⁶
- Reglamento (UE) nº 594/2012 por el que se fija el contenido máximo de ocratoxina A, PCBs no similares a las dioxinas y melamina en los productos alimenticios.⁵⁷
- Reglamento (UE) nº 1058/2012 en lo que respecta al contenido máximo de aflatoxinas en los higos secos.⁵⁸
- Reglamento (UE) nº 212/2014 en lo que concierne a los contenidos máximos del contaminante citrinina en complementos alimenticios basados en arroz fermentado con levadura roja *Monascus purpureus*.⁵⁹

Teniendo en cuenta el reglamento (CE) nº 1881/2006 y sus posteriores modificaciones, en la Tabla 1 se recogen los LMRs permitidos por la Unión Europea en función del alimento y del destino o el procesamiento del mismo.

Como se puede observar en la Tabla 1, no existen LMRs para las toxinas T-2 y HT-2. Sin embargo, se han incluido ya que en la recomendación 2013/165/UE se indica que “los Estados miembros, con la participación activa de las empresas alimentarias y de piensos, deben realizar el control de la presencia de toxinas T-2 y HT-2 en los cereales y los productos a base de cereales”.⁶⁰ En esta recomendación, aparte de dar indicaciones sobre los estudios que se deben realizar y los límites de detección y cuantificación que se deberían tener en cuenta, también se incluye un listado de cereales y productos derivados con niveles indicativos para la suma de T-2 y HT-2 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a partir, o por encima de los cuales, deben realizarse investigaciones, sobre todo en caso de resultados repetidos.

Tabla 1. Contenidos máximos de determinadas micotoxinas en los productos alimenticios establecidos por la Directiva Europea según el reglamento (CE) nº 1881/2006 y sus posteriores modificaciones incluyendo los reglamentos (CE) nº 1126/2007 y (UE) nº 105/2010, 165/2010, 594/2012, 1058/2012 y 212/2014.⁵³⁻⁵⁹

Micotoxina	Alimento	Contenido máximo ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
Aflatoxinas	Cacahuetes	B ₁	Total	M ₁
	Sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes	8	15	--
	Consumo humano directo o uso como ingrediente	2	4	--
	Avellanas y nueces de Brasil	B ₁	Total	M ₁
	Sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes	8	15	--
	Consumo humano directo o uso como ingrediente	5	10	--
	Almendras y pistachos	B ₁	Total	M ₁
	Sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes	12	15	--
	Consumo humano directo o uso como ingrediente	8	10	--
	Frutos de cáscara (excepto anteriores)	B ₁	Total	M ₁
	Sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes	5	10	--
	Consumo humano directo o uso como ingrediente	2	4	--
	Higos secos	B ₁	Total	M ₁
	Higos secos	6	10	--
	Frutos secos (excepto higos secos)	B ₁	Total	M ₁
	Sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes	5	10	--

Tabla 1. Continuación

Micotoxina	Alimento	Contenido máximo ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
Aflatoxinas	Frutos secos (excepto higos secos)	B ₁	Total	M ₁
	Consumo humano directo o uso como ingrediente	2	4	--
	Huesos de albaricoque	B ₁	Total	M ₁
	Sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes	12	15	--
	Consumo humano directo o uso como ingrediente	8	10	--
	Arroz	B ₁	Total	M ₁
	Sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes	5	10	--
	Consumo humano directo o uso como ingrediente	2	4	--
	Cereales y productos procesados	B ₁	Total	M ₁
	Cereales y productos procesados	2	4	--
	Maíz	B ₁	Total	M ₁
	Sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes	5	10	--
	Espicias	B ₁	Total	M ₁
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Capsicum spp.</i> (chiles, chile en polvo, cayena y el pimentón) • <i>Piper spp.</i> (pimienta blanca y negra) • Nuez moscada • Jengibre • Cúrcuma • Mezclas de las anteriores 	5	10	--
	Semillas oleaginosas	B ₁	Total	M ₁
	Productos procesados a excepción de los aceites vegetales	2	4	--
	Para su posterior procesamiento	8	15	--

Tabla 1. Continuación

Micotoxina	Alimento	Contenido máximo ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
Aflatoxinas	Alimentos infantiles y cereales procesados	B ₁	Total	M ₁
	Para lactantes y niños de corta edad (materia seca)	0.1	--	--
	Leche	B ₁	Total	M ₁
	Cruda, tratada y para fabricación de productos lácteos	--	--	0.050
	Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación	--	--	0.025
	Alimentos dietéticos	B ₁	Total	M ₁
	Uso médico especiales dirigido específicamente a los lactantes	0.1	--	0.025
Patulina	Total			
	Zumos de frutas, zumos de frutas concentrados reconstituidos y néctares de frutas	50		
	Bebidas espirituosas, sidra y otras bebidas fermentadas elaboradas con manzanas o que contengan zumo de manzana	50		
	Productos sólidos elaborados con manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana	25		
	Zumo de manzana y productos sólidos elaborados a base de manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados a los lactantes y niños de corta edad	10.0		
	Alimentos infantiles distintos de los alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad	10.0		
Ocratoxina A	Total			
	Cereales no procesados	5.0		
	Productos cereales (a excepción de los que se nombren a continuación)	3.0		
	Gluten de trigo (no destinado a la venta directa al consumidor)	8.0		
	Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10.0		

Tabla 1. Continuación

Micotoxina	Alimento	Contenido máximo ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Ocratoxina A	Total	
	Vino (tinto, blanco, rosado y espumoso) y vinos de frutas. Excluyendo vinos de licor y los vinos con grado alcohólico mínimo de 15% vol.	2.0
	Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2.0
	Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo	2.0
	Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5.0
	Café soluble (café instantáneo)	10.0
	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0.50
	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0.50
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Capsicum spp.</i> (chiles, chile en polvo, cayena y el pimentón) • <i>Piper spp.</i> (pimienta blanca y negra) • Nuez moscada • Jengibre • Cúrcuma • Mezclas de las anteriores 	15
	Raíz de regaliz	20
	Extracto de regaliz	80
Deoxivalenol	Total	
	Cereales no elaborados que no sean trigo duro, avena y maíz	1250
	Trigo duro y avena no elaborados	1750

Tabla 1. Continuación

Micotoxina	Alimento	Contenido máximo ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Deoxivalenol	Total	
	Maíz no elaborado (a excepción del maíz para molienda en húmedo)	1750
	Cereales destinados al consumo humano directo: <ul style="list-style-type: none"> • Harina de cereales • Salvado y germen • Fracciones de molienda de maíz con un tamaño de partícula $> 500 \mu\text{m}$ a excepción de los productos enumerados a continuación	750
	Fracciones de molienda de maíz con un tamaño de partícula $\geq 500 \mu\text{m}$ incluyendo harina de maíz y maíz triturado y molido	1250
	Pasta (seca)	750
	Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno	500
	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200
Fumonisin	$\text{FB}_1 + \text{FB}_2$	
	Maíz no elaborado (a excepción del maíz para molienda en húmedo)	4000
	Fracciones de molienda de maíz con un tamaño de partícula $> 500 \mu\text{m}$	1400
	Fracciones de molienda de maíz con un tamaño de partícula $\geq 500 \mu\text{m}$ incluyendo harina de maíz y maíz triturado y molido	2000
	Maíz destinado al consumo humano directo a excepción de los productos enumerados a continuación	1000
	Cereales para el desayuno a base de maíz y aperitivos de maíz	800
	Alimentos elaborados a base de maíz y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200

Tabla 1. Continuación

Micotoxina	Alimento	Contenido máximo ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Zearalenona	Total	
	Cereales no elaborados distintos al maíz	100
	Maíz no elaborado (a excepción del maíz para molienda en húmedo)	350
	Cereales destinados al consumo humano directo: <ul style="list-style-type: none"> • Harina de cereales • Salvado y germen a excepción de los productos enumerados a continuación	75
	Fracciones de molienda de maíz con un tamaño de partícula $< 500 \mu\text{m}$	200
	Fracciones de molienda de maíz con un tamaño de partícula $\geq 500 \mu\text{m}$ incluyendo harina de maíz y maíz triturado y molido	300
	Aceite de maíz refinado	400
	Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno, excluidos los aperitivos de maíz y los cereales para el desayuno a base de maíz	50
	Maíz destinado al consumo humano directo, aperitivos de maíz y cereales para el desayuno a base de maíz	100
	Alimentos elaborados a base de cereales (excluidos los alimentos elaborados a base de maíz) y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	20
	Alimentos elaborados a base de maíz para lactantes y niños de corta edad	20
Citrinina	Total	
	Complementos alimenticios a base de arroz fermentado con levadura roja <i>Monascus purpureus</i>	2000
Toxinas T2 y HT2	Total	
	Límites bajo estudio / discusión	

La legislación europea recoge tanto los LMRs que pueden contener los alimentos como las regulaciones y recomendaciones a la hora de realizar los muestreos y los análisis, la entrega de resultados y la validación de los métodos de análisis. En lo que respecta a las micotoxinas, se publicó el reglamento (CE) nº 401/2006 *por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios* y sus posteriores modificaciones con los reglamentos (UE) nº 178/2010 y nº 519/2014.⁶¹⁻⁶³

Como se discute en este apartado, existen ciertas micotoxinas para las que aún no se han establecido contenidos máximos permitidos ni se contemplan a nivel de recomendación, como en el caso de las toxinas T-2 y HT-2. Es por ello que la Comisión Europea ha pedido a la EFSA que revise la inocuidad de ciertas micotoxinas.

Entre ellas cabe destacar las producidas por hongos de la familia de la *Alternaria* que han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. Hasta el momento se han encontrado indicios de que, tanto el AOH como el TeA, representan un riesgo para la salud.⁶⁴ No obstante, dado que existen pocos datos acerca de la toxicidad de estas micotoxinas se utilizó el criterio del umbral de preocupación toxicológica (TTC) para evaluar el nivel relativo de preocupación por la exposición dietética a las mismas en seres humanos. Para las toxinas genotóxicas, AOH y AME, la exposición dietética crónica estimada excedió el valor pertinente de TTC, lo que indica una necesidad de disponer de datos adicionales de toxicidad. Las estimaciones de exposición dietética para la tentoxina, no genotóxica, y el ácido tenuazónico son inferiores al valor de TTC pertinente y se considera poco probable que sean un problema de salud humana.⁴¹

Teniendo en cuenta esta opinión, la Comisión Europea está considerando la posibilidad de establecer LMRs para ciertas toxinas de *Alternaria* en los alimentos. Por ello, solicitó a la EFSA en 2016 que llevara a cabo una evaluación de la exposición humana a dichos compuestos.⁶⁵

Actualmente se está trabajando en el desarrollo de métodos analíticos, sensibles y selectivos, que permitan determinar el contenido de micotoxinas en una amplia variedad de alimentos. Además, se están realizando importantes avances en el estudio

de aquellas toxinas para las que aún no existe legislación y para las que debe evaluarse su incidencia sobre la salud humana.

5.1.4. Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas

Existe una gran diversidad de métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en muestras de alimentos. Dado que suelen encontrarse en matrices relativamente complejas, generalmente todos ellos incluyen una etapa de extracción, una etapa de limpieza y, en ocasiones, una etapa de preconcentración. Una vez aislados de la matriz, los analitos de interés se determinan empleando diversas técnicas analíticas. Los métodos de análisis más habituales se basan en el empleo de técnicas cromatográficas, no obstante, también se ha descrito la aplicación de otros métodos de análisis para su determinación, por ejemplo, aquellos basados en el empleo de biosensores que permiten agilizar y facilitar las medidas “in situ”.

En la actualidad existe una tendencia hacia la automatización que permita reducir la manipulación de la muestra. Además, se ha generalizado la búsqueda de métodos de extracción que permitan reducir el tiempo de análisis y minimizar tanto el consumo de disolventes orgánicos como la cantidad de muestra requerida para el análisis. Asimismo, se ha generalizado el uso de métodos de extracción basados en la denominada química verde, de manera que se utilice la menor cantidad posible de disolventes y/o reactivos perjudiciales para el medio ambiente.

A continuación, se recogen los trabajos más representativos, publicados en los últimos años, sobre el análisis de micotoxinas, en especial las pertenecientes al género *Alternaria*, ya que son el principal objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. Se ha hecho especial hincapié tanto en el tratamiento de muestra como en el análisis. Los métodos se han clasificado en dos grupos, cromatográficos y no cromatográficos.

5.1.4.1. Tratamiento de la muestra: métodos de extracción, limpieza y preconcentración

El tratamiento de la muestra suele ser la etapa más crítica a la hora de llevar a cabo la cuantificación de cualquier analito, especialmente en matrices complejas. La técnica utilizada dependerá tanto del compuesto a analizar como de la naturaleza de la muestra y de los componentes de la misma. La complejidad de la matriz, en muchas

ocasiones, limita la sensibilidad y robustez del método de análisis, siendo necesario minimizar dichas interferencias mediante el tratamiento previo de la muestra antes de su análisis.

La extracción de micotoxinas se realiza, en general, empleando distintos disolventes orgánicos y extracciones clásicas con agitación líquido-líquido (LLE, del inglés *liquid-liquid extraction*) o sólido-líquido (SLE, del inglés *solid-liquid extraction*).⁶⁶⁻⁶⁹ Estas técnicas se basan en la solubilidad de los analitos en el disolvente seleccionado y la insolubilidad de los interferentes en el mismo. Muchas micotoxinas son solubles en disolventes polares e insolubles en disolventes apolares.⁷⁰ No obstante, suelen ser solubles en disolventes orgánicos como metanol, acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, cloroformo o diclorometano. Aunque algunas especies, como las fumonisinas, son solubles en agua ésta no suele ser la norma general. A pesar de ello, es común utilizar mezclas de disolventes orgánicos con cierta cantidad de agua para incrementar su penetración en las matrices, mejorando con ello la eficiencia de extracción. Si además el agua se encuentra acidulada, se facilita la ruptura de los enlaces entre el analito y los componentes de la matriz, tales como azúcares o proteínas, lo que mejora aún más el rendimiento del proceso.⁷¹ También se ha descrito la extracción con mezclas hidro-orgánicas, asistidas o no por ultrasonidos, extracción con líquidos presurizados (PLE, del inglés *pressurized liquid extraction*), extracción mediante el método QuEChERS (del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), clásico o con modificaciones, y otras técnicas más específicas que se detallan posteriormente.

Tanto en el caso de la LLE, como de la SLE, es necesario tener en cuenta la solubilidad de los analitos en el disolvente. Normalmente se utiliza un único disolvente o mezclas de disolventes inmiscibles entre sí para realizar la extracción. Sin embargo, en algunos casos se debe recurrir al empleo de disolventes orgánicos polares para incrementar el rendimiento de esta etapa, lo que va en contra de la separación de fases. El empleo de mezclas de disolventes orgánicos polares miscibles con el agua y entre sí requiere la adición de sales que faciliten la separación de fases e induzcan la inmiscibilidad entre ellos. De esta manera los analitos pasan de la fase acuosa a la fase orgánica polar. Entre las mezclas más comunes de disolventes se encuentran las combinaciones acetato de etilo con agua,^{72,73} acetato de etilo con agua y metanol o

acetonitrilo,⁷⁴ o acetonitrilo y/o metanol con agua.^{75,76} Todas estas combinaciones pueden contener un pequeño porcentaje de ácido fórmico, o acético, para mejorar la extracción.⁷⁷⁻⁷⁹ Dependiendo del tipo de alimento, y para incrementar la limpieza de los extractos, en ocasiones se añade hexano, durante o después de la extracción, para evitar interferencias o problemas debidos a la presencia de grasas, especialmente en el caso de semillas de oleaginosas o cereales.^{72,80,81} Las extracciones pueden estar asistidas por ultrasonidos (UAE, del inglés *ultrasound-assisted extraction*), ya que la aplicación de esta técnica puede mejorar la eficacia de extracción y reducir los tiempos de análisis, aunque su empleo no está generalizado.^{43,82,83} Normalmente las recuperaciones obtenidas son buenas ($\geq 60\%$) aunque se requieren varias etapas que aseguren la extracción de un gran número de micotoxinas, lo que incrementa la manipulación de la muestra disminuyendo la reproducibilidad. Además, suelen consumirse grandes volúmenes de disolvente y pueden ser necesarias varias etapas de centrifugación y filtración lo que incrementa los tiempos de análisis.

Una alternativa a la extracción clásica es la PLE. Si bien esta técnica se utilizó inicialmente para el tratamiento de muestras medioambientales, su empleo se ha extendido a la extracción de diferentes tipos de compuestos en todo tipo de muestras, incluyendo los alimentos.⁸⁴ La PLE permite el tratamiento de muestras sólidas o semisólidas. Su principal ventaja, además de ser automatizable, es la reducción de los tiempos de extracción, así como del volumen de disolvente utilizado, gracias al empleo de elevadas presiones y temperaturas que facilitan la extracción de los analitos.⁸⁵ Esta técnica se ha empleado para la extracción de micotoxinas tales como aflatoxinas, ocratoxina A o zeralenona en diferentes matrices.⁸⁶⁻⁸⁸ El problema de esta técnica es la necesidad de asegurar la estabilidad de los analitos en las condiciones de presión y temperatura seleccionadas. Además, es necesario optimizar otros parámetros característicos de la técnica (tiempo y volumen de extracción, naturaleza del disolvente, número de ciclos, etc.) para extraer cuantitativamente las micotoxinas sin coextraer componentes de la matriz, que podrían afectar al análisis requiriendo el empleo posterior de métodos de limpieza.

Recientemente se han desarrollado dos técnicas que, aprovechándose de las capacidades excepcionales de sensibilidad y separación de los equipos modernos de LC-

MS, permiten desarrollar métodos de análisis multianalito, simplificando los métodos de análisis y reduciendo los tiempos de análisis. Se trata de las técnicas “Diluir e Inyectar” o DaS (del inglés *dilute and shoot*) y los protocolos QuEChERS.⁸⁹

El técnica DaS no es exactamente una técnica de preparación de muestra, sino que se basa en la dilución de la muestra seguida de una inyección directa en el cromatógrafo, asumiendo que algunas muestras están suficientemente limpias, tras su dilución. En el caso de los alimentos no es posible aplicar esta técnica tal y como está definido, ya que en muchos casos no se trabaja con muestras líquidas. Algunos autores consideran que la dilución del extracto obtenido tras realizar la extracción con una mezcla de acetonitrilo, agua y ácido acético es un método DaS.⁹⁰ Sin embargo, en la mayoría de los casos esta aproximación no se considera como tal. El principio de dilución-inyección ha sido utilizado extensamente debido sus múltiples beneficios^{47,79,91,92} entre los que se incluye la eliminación de la etapa de limpieza, evitando la pérdida de analitos en la misma y reduciendo los tiempos de análisis. Sin embargo, la aparición de potenciales interferentes y componentes de la matriz en el extracto final puede resultar fatal para los equipos cromatográficos y los espectrómetros de masas, siendo ésta una de las grandes limitaciones de esta técnica. Es por ello que para utilizar DaS se precisan instrumentos con una elevada sensibilidad y métodos muy selectivos donde estas desventajas se minimicen.

Los protocolos QuEChERS, diseñados inicialmente para el análisis de pesticidas en alimentos, han ganado una gran popularidad en el análisis de micotoxinas debido a su sencillez y a su efectividad en este campo. Este método incluye dos etapas diferenciadas. La primera consiste en una extracción con disolventes, generalmente una mezcla acetonitrilo-agua, y en una separación de fases mediante la adición de sales. El disolvente más utilizado para este tipo de extracción es el acetonitrilo debido a su gran capacidad para la extracción selectiva de compuestos con una amplia gama de polaridades. Otra de las ventajas es su miscibilidad con el agua, lo que permite una mayor penetración en las muestras acuosas, permitiendo también una separación de fases relativamente sencilla mediante la adición de sales, evitando el uso de disolventes no polares. Además, en alimentos con alto contenido graso reduce la coextracción de compuestos lipofílicos en comparación con otros disolventes de naturaleza semejante.

En lo que respecta a las sales, lo que se busca es una separación de fases que mejore la extracción de componentes polares. Una de las más utilizadas es el MgSO_4 , que adsorbe grandes cantidades de agua en una reacción exotérmica que puede alcanzar temperaturas de 45 °C, favoreciendo la extracción de los compuestos. Por lo general se suele utilizar en combinación con NaCl, ya que se evita la extracción de componentes no deseados de la matriz y se mejora la resolución de los picos en las separaciones cromatográficas.⁹³ No obstante, es posible encontrar otras combinaciones de sales dependiendo de la matriz a analizar y del control de pH que se necesite.^{94,95} En la segunda etapa se realiza una limpieza y secado mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE, del inglés *dispersive solid phase extraction*). La elección del material depende de los interferentes que se quieran eliminar pudiéndose utilizar *N*-propiletildiamina, o PSA (del inglés *primary secondary amine*),^{96,97} C_{18} ^{98,99} o combinaciones de ambos,¹⁰⁰ adicionándose en ocasiones MgSO_4 para mejorar la extracción. Hay que mencionar que, aunque no es habitual, se han publicado trabajos en los que en lugar de utilizar d-SPE, se utilizan cartuchos de extracción en fase sólida (SPE, del inglés *solid-phase extraction*) convencionales para la limpieza de la muestra.¹⁰¹ También se han descrito métodos modificados que consideran al MgSO_4 como sorbente y no emplean una fase de d-SPE para la extracción de las micotoxinas.^{44,83,102,103}

Finalmente, hay que destacar el empleo de otras técnicas alternativas a las mencionadas anteriormente para mejorar la separación de las micotoxinas, o para adaptarse a las necesidades del método de análisis. Un ejemplo es la cromatografía en contracorriente (CCC, del inglés *countercurrent chromatography*), basada en el reparto de los analitos entre dos líquidos inmiscibles cuando interactúan en un pequeño tubo bajo un campo centrífugo. Combina las ventajas de la LLE unida a la elución continua lo que mejora la eficiencia de partición. Esta técnica permite el análisis de muestras complejas y sin tratar. Combinada con el uso de líquidos iónicos como modificadores ha permitido alcanzar bajos límites de detección y elevadas recuperaciones de micotoxinas en muestras de vino.¹⁰⁴

Tras la extracción de los analitos en muchos casos es necesario aplicar una etapa de limpieza y/o preconcentración previa al análisis. Esto suele llevarse a cabo empleando un proceso SPE, comúnmente en modo *off-line*, utilizando columnas comerciales. Las

muestras se cargan en los cartuchos y, tras uno o varios lavados con disolventes de diversa naturaleza, se eluyen en el medio adecuado. Si el disolvente empleado no es compatible con la técnica de análisis se puede evaporar y reconstituir en una fase más adecuada. Los cartuchos empleados pueden ser de distintos tipos, en función de las interacciones establecidas entre el sorbente y la micotoxina, utilizándose columnas de fase inversa (normalmente C₁₈, Strata C18, Strata XL),¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ fases poliméricas de poli-di-vinilbenceno/N-vinilpirrolidona (Oasis HLB)^{68,72,109} o PS-DVB (Bond Elut Plexa)⁷⁶ y grupos aminopropilo (Gracepure amine).^{74,81}

Aunque estas columnas son genéricas para multitud de analitos también se han desarrollado columnas específicas para micotoxinas basadas en intercambio iónico (Bond Elut Mycotoxin),¹¹⁰ o más específicas para tricotecenos como Mycosep 227 de composición patentada.¹¹¹ Además, se han desarrollado materiales basados en el reconocimiento molecular selectivo que mejora la extracción frente a matrices complejas, como es el caso de los materiales de impronta molecular, descritos con mayor detalle en el apartado 5.4.^{43,112-114}

5.1.4.2. Métodos de análisis cromatográficos

Las técnicas cromatográficas, en sus diferentes modalidades, son las más utilizadas para el análisis de micotoxinas en alimentos. Su popularidad ha ido en aumento gracias al desarrollo de detectores cada vez más sensibles que permiten llevar a cabo determinaciones de estos compuestos a nivel de trazas. En los últimos años se han publicado multitud de trabajos sobre el análisis de micotoxinas empleando cromatografía líquida (HPLC o UPLC) y, en menor medida, cromatografía de gases (GC) o cromatografía en capa fina (TLC).

Los análisis mediante TLC y GC han caído en desuso debido a su menor sensibilidad en comparación con las publicaciones más recientes basadas en cromatografía líquida (LC). No obstante, se han desarrollado métodos que utilizan estos dos tipos de cromatografías para fines concretos y que ofrecen alguna ventaja frente a aquellos basados en LC.^{115,116} La principal desventaja de la GC es la necesidad de que los analitos sean volátiles, o al menos que se puedan derivatizar transformándose en compuestos volátiles, lo que añade una etapa adicional al análisis. Además, existen

riesgos de contaminación de la columna de forma que los métodos desarrollados deben tener en cuenta este problema e incluir etapas de limpieza previa al análisis de las muestras.¹¹⁷

La cromatografía de líquidos es la técnica por excelencia para el análisis de micotoxinas. Puede acoplarse a detección por espectrometría de masas (LC-MS),^{101,102} absorción UV-VIS (LC-DAD),^{97,104} o fluorescencia (LC-FLD)⁴³ debido a la gran variedad de micotoxinas existentes y a sus diferentes propiedades. Además, es la técnica de referencia para la validación de otros métodos.^{66,109}

Las técnicas de LC-MS y LC-MS/MS son las más utilizadas actualmente en el análisis de micotoxinas. Presentan un buen número de ventajas frente a otras técnicas de análisis tales como una elevada sensibilidad, la posibilidad de obtener información estructural y la gran especificidad basada en las relaciones masa-carga (m/z). Su empleo para este tipo de análisis se generalizó gracias al desarrollo de las técnicas de ionización, como el electrospray o la ionización a presión atmosférica.¹¹⁸ Además de lo comentado anteriormente, la necesidad de realizar el análisis simultáneo de diversas micotoxinas en una misma muestra y el desarrollo de espectrómetros cada vez más sensibles ha favorecido que los detectores de masas hayan desbancado, en muchos casos, a los basados en técnicas espectroscópicas de absorción o emisión. Por otra parte, los detectores de masas en tándem (MS^n), que permiten una mejor identificación de los diferentes compuestos, están desplazando a su vez al LC-MS ya que permiten la confirmación inequívoca de las micotoxinas detectadas.¹¹⁹

El análisis de contaminantes en alimentos, y en especial de micotoxinas, mediante LC-MS se puede realizar en dos modalidades. En la primera aproximación se puede utilizar la LC-MS como método de cribado inicial a fin de llevar a cabo una evaluación cualitativa de la presencia de un gran número de compuestos. Las técnicas de cribado pueden ser específicas o no específicas. La primera de ellas es la más utilizada para el análisis de micotoxinas y se basa en el desarrollo y validación de un método de adquisición para una determinada lista de analitos conocidos. Si bien esta aproximación reduce tiempos y requiere detectores relativamente convencionales, como puede ser un triple cuadrupolo (QqQ) su alcance es limitado y no tiene en cuenta la presencia de otros

compuestos de interés no considerados inicialmente. La segunda aproximación permite, por el contrario, detectar tanto compuestos inesperados como desconocidos. En este caso no se dispone de información sobre las condiciones óptimas de ionización o los tiempos de retención, lo que dificulta su aplicación. Se realiza así una adquisición completa del espectro de masas, lo que permite monitorizar la presencia de metabolitos u otros productos de transformación, además de sustancias desconocidas. En este caso se precisa disponer de espectrómetros de alta resolución, como por ejemplo el Orbitrap, que permiten la determinación precisa de compuestos con elevada resolución m/z .¹²⁰ Las técnicas no específicas o no dirigidas han supuesto un gran avance en el estudio de la metabolómica de las micotoxinas, haciendo posible la identificación de compuestos desconocidos en función de los diferentes fragmentos obtenidos mediante espectrometría de masas de alta resolución (HRMS).^{121,122}

La siguiente etapa del análisis es la cuantificación de las micotoxinas detectadas en la muestra. Aunque en la última década se han utilizado instrumentos de HRMS para este fin, el uso de equipos QqQ sigue siendo el estándar utilizado para la determinación de estos compuestos.¹²⁰ El desarrollo de sistemas de varios sectores ha permitido trabajar de manera sensible y selectiva ya que se puede monitorizar la pareja ion parental/ion fragmento, denominada transición. Este modo de trabajo se denomina monitorización selectiva de reacciones (SRM, del inglés *selective reaction monitoring*) o monitorización múltiple de reacciones (MRM, del inglés *multiple reaction monitoring*). Estas transiciones son altamente específicas y permiten una identificación prácticamente inequívoca de un analito determinado. La gran especificidad es posible gracias a que en el espectrómetro de masas sólo se aíslan los compuestos que cumplen ambos criterios, es decir, el ion precursor específico y los iones fragmento específicos correspondientes a la masa de la molécula de interés, ignorando todos los demás iones que alcanzan el espectrómetro de masas.¹²³ Cabe mencionar que, de acuerdo con la normativa europea 2002/657/EC respecto a los métodos analíticos y a la interpretación de resultados, para cada molécula objetivo es necesario determinar dos transiciones. Además la intensidad relativa de estas transiciones, junto con el tiempo de retención y la relación señal ruido, permite confirmar la identidad del compuesto detectado.¹²⁴

Aunque las primeras aplicaciones de las técnicas LC-MS y LC-MS/MS se enfocaron al análisis de una única micotoxina, a día de hoy estos estudios se dedican principalmente al análisis multianalito, pudiéndose determinar más de 100 micotoxinas y metabolitos en un único análisis.^{77,92} Otra de las aplicaciones que está cobrando interés en los últimos años en el análisis múltiple es el estudio tanto de las micotoxinas y sus metabolitos, así como de las versiones modificadas de estas. Las denominadas micotoxinas modificadas (conocidas anteriormente como enmascaradas) son aquellas que han sido modificadas biológica o químicamente por organismos vivos. Dado que en muchos casos se desconoce su toxicidad, se están realizando esfuerzos importantes para llevar a cabo su determinación conjunta con las micotoxinas precursoras, evaluando a su vez su posible efecto sinérgico para la salud.^{80,125}

A pesar de las grandes ventajas que presentan las técnicas cromatográficas, acopladas o no a MS, también hay que tener en cuenta las posibles limitaciones. De hecho, una de las más importantes es el efecto matriz, especialmente en el caso del análisis de micotoxinas en muestras complejas. Se ha recurrido a diferentes estrategias para minimizar este problema. La más común es el empleo de “*matrix-matched calibration standards*”, es decir, el empleo de una matriz limpia (en ausencia de analito o a concentraciones inferiores al límite de detección del método) para generar la curva de calibración.¹²⁶ Alternativamente, se puede emplear el método del patrón interno, especialmente cuando se lleva cabo el análisis mediante HPLC-MS. Lo más común es utilizar un compuesto marcado isotópicamente que tenga el mismo comportamiento químico que el analito de interés, y que pueda identificarse en MS. El uso de isótopos marcados para este fin se conoce como dilución isotópica estable o SIDA (del inglés *stable isotope dilution assay*) y se basa en una modificación de las relaciones isotópicas naturales al añadir los compuestos marcados.^{78,105,106} No obstante, en muchas ocasiones se añaden simplemente como un patrón interno, sin ser considerado un SIDA, aplicándose al análisis de compuestos iguales, o estructuralmente similares, obteniendo de igual manera buenos resultados.^{80,103,127,128}

La derivatización se utiliza para transformar a las micotoxinas en compuestos volátiles susceptibles de ser separados y analizados mediante GC. No obstante, el uso de derivatizantes también se ha aplicado en la LC para mejorar la determinación de

dichos compuestos. Uno de los casos más destacables es el del ácido tenuazónico, el cual muestra comportamientos cromatográficos irreproducibles, lo que hace necesaria dicha derivatización.¹²⁹ El uso de un modificador como el ZnSO_4 en la fase móvil permite mejorar la solubilidad, la resolución y los tiempos de retención de esta especie, aunque su incompatibilidad con MS hace que su uso quede restringido a la detección por absorción UV-VIS ($\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$).¹³⁰ La 2,4-dinitrofenilhidrazina o DNPH se ha utilizado como derivatizante para métodos LC-MS permitiendo alcanzar buenos límites de detección para TeA en muestras complejas, incluso en presencia de otras micotoxinas.^{131,132} Sin embargo, el uso de los ya comentados patrones internos marcados isotópicamente ha desplazado estas derivatizaciones que, en ocasiones, entorpecen y ralentizan el análisis.

5.1.4.3. Métodos de análisis no cromatográficos

En bibliografía también se han descrito diversos métodos de análisis no cromatográficos para determinación de micotoxinas, algunos de los cuales se describen a continuación.

Los inmunoensayos se basan en el uso de anticuerpos como elementos de reconocimiento selectivo, lo que los hace idóneos para la identificación de micotoxinas en alimentos. De entre todos los métodos se pueden destacar los ensayos tipo ELISA (del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), en los cuales una enzima covalentemente unida al anticuerpo es el elemento generador de señal, o derivados que utilizan moléculas fluorescentes en lugar de enzimas. Generalmente, una de las principales limitaciones reside en la incapacidad de los anticuerpos para diferenciar dentro de una familia de micotoxinas debido a su similitud estructural. Sin embargo, es posible llevar a cabo el reconocimiento de una familia específica de analitos, dada la semejanza estructural entre ellos, de forma que el método puede ser usado para el cribado y clasificación de las muestras en contaminadas y no contaminadas. En muchas ocasiones el tratamiento de muestra es nulo o mínimo, basado generalmente en LLE y SLE, teniendo en cuenta el uso de una disolución reguladora que contenga a los analitos en condiciones óptimas para el ensayo. Este tipo de ensayos se ha aplicado al análisis de alternariol,^{66,133} aflatoxinas¹³⁴ o zearalenona,¹³⁵ entre otros. Además, cada vez lo que se

busca es la posibilidad del multi-sensado mediante plataformas que permitan determinar diferentes micotoxinas en un único análisis.¹³⁶

Basados en el mismo principio de inmunoafinidad se pueden encontrar los ensayos de flujo lateral o LFIA (del inglés *Lateral Flow Immunoassay*) en los que el inmunoensayo se desarrolla mediante capilaridad. Se ha aplicado de forma exitosa para el análisis de TeA y AOH en muestras de trigo y zumo de manzana, permitiendo tanto un análisis de cribado como cuantitativo a partir de la medida de la intensidad de color de la banda de detección.^{47,137} El uso de este tipo de materiales se ha incrementado debido a la demanda existente de ensayos instantáneos o *point-of-care* que permitan la detección rápida de uno o varios analitos simultáneamente. Estos ensayos son fáciles de utilizar por personas sin un entrenamiento específico y son sistemas baratos de producir, lo que facilita su uso a nivel doméstico e industrial en las etapas de producción y procesado de alimentos.¹³⁸ A pesar de que se trata de un método sencillo, que permite el análisis *in-situ* de las muestras, su aplicación a nivel práctico aún está lejos de la de los métodos clásicos, siendo una buena alternativa como método de cribado.

Siguiendo en la línea de los sistemas *point-of-care* y la simplificación de los métodos de detección de micotoxinas, se ha desarrollado un buen número de kits comerciales para llevar a cabo la detección cualitativa y cuantitativa de algunas de las más importantes. Estos kits se basan, en general, en ensayos ELISAs o emplean tiras reactivas y son tan variados como las necesidades existentes. Diversas casas comerciales han desarrollado aplicaciones móviles o dispositivos portátiles para convertir los ensayos cualitativos en (semi)cuantitativos sin necesidad de utilizar equipos de detección caros y de gran tamaño, aumentando las posibilidades de estos sistemas. En la Tabla 2 se resumen las características analíticas de algunos métodos de barrido (en inglés *screening*) comerciales para el análisis de micotoxinas.

Independientemente de que se trate de métodos comerciales o no, la mayoría de ellos se basan en inmunoensayos de diferentes tipos, lo cual confirma la importancia de esta técnica para este tipo de análisis. No obstante, una de las limitaciones de los inmunoensayos, en especial de los competitivos, es la necesidad de disponer de un derivado marcado del analito en cuestión para llevar a cabo el ensayo.

Tabla 2. Resumen de las características analíticas de métodos comerciales desarrollados para la determinación de micotoxinas en matrices alimentarias.

Casa comercial	Tipo de ensayo	Micotoxinas detectadas	Intervalo concentración** ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
ROMER labs	LFIA	Aflatoxinas	q: ≥ 4 ; Q*: 3.3 – 600
		Deoxinivalenol	Q*: 100 – 30000
		Zearalenona	Q*: 30 – 1000
		Fumonisin	Q*: 30 – 1000
	ELISA	Aflatoxinas	0.9 – 50
		Ocratoxinas	2 – 40
		Fumonisin	250 – 5000
		Deoxinivalenol	250 – 5000
		Zearalenona	25 – 1000
		T-2	20 – 500
	Fluorimetría	Aflatoxinas	0.6 - 3
VICAM	LFIA	Aflatoxinas	q: ≥ 10 ; Q*: 2 – 100
		Deoxinivalenol	q: ≥ 1000 ; Q*: 200 – 10000
		Fumonisin	Q*: 200 – 100000
		Ocratoxinas	Q*: 2.5 – 100
NEOGEN corp.	LFIA	Aflatoxinas	q: ≥ 10 ; Q*: 10 – 20
		Deoxinivalenol	Q*: 0.5 – 2
	ELISA	Aflatoxinas	1 – 100
		Ocratoxinas	2 – 25
		Deoxinivalenol	0.25 – 5000
		Fumonisin	50 – 6000
		T-2	25 – 250
		Zearalenona	25 - 500
r-biopharm	LFIA	Aflatoxinas	Q*: 4 – 150
		Deoxinivalenol	Q*: 500 – 5500
		Fumonisin	Q*: 300 – 10000
		T-2 y HT-2	Q*: 50 – 1000
		Zearalenona	Q*: 50 – 1000
	ELISA	Aflatoxinas	1 – 4
		Citrinina	15 – 405
		Deoxinivalenol	74 – 6000
		Fumonisin	25 – 6000
		Ocratoxina A	0.05 – 40
		T-2 y HT-2	3.5 – 560
		Zearalenona	50 – 1000
	Tarjetas	Aflatoxinas	q: 2 – 30
		Ocratoxinas	q: 3 – 10

* Se requiere equipo de lectura. ** El intervalo de concentración incluye los valores disponibles en los diferentes kits comercializados para la determinación de la micotoxina indicada. Estos intervalos pueden variar en función de la dilución de la muestra. q: cualitativos; Q: (semi)cuantitativos; LFIA: inmunoensayo de flujo lateral; ELISA: inmunoensayo enzimático en fase heterogénea.

En los últimos años se ha trabajado en la sustitución de estas micotoxinas por otras moléculas que se comporten de forma análoga al analito en presencia del anticuerpo, evitando los problemas a nivel económico y de toxicidad. Este es el caso de los mimótopos o péptidos capaces de unirse a un anticuerpo dirigido contra algún ligando a pesar de no presentar semejanzas con este último. El uso de fagos y de la técnica “*phage display*” ha permitido el desarrollo de mimótopos para algunas micotoxinas, como OTA, AFs o FB₁ y su empleo ha facilitado el desarrollo de inmunoensayos con buenos límites de detección.¹³⁹⁻¹⁴¹

Finalmente, Pavón y col.¹⁰⁹ han descrito un método basado en PCR que permite identificar una secuencia de ADN común a la especie *Alternaria*. Si bien no se trata de un método directo para la detección de micotoxinas, sí que permite la identificación de muestras contaminadas para su posterior análisis mediante HPLC-MS.

A modo de resumen, en la Tabla 3 se han recogido las principales características analíticas de los principales métodos analíticos descritos en bibliografía, tanto cromatográficos como no cromatográficos, para la determinación de las micotoxinas estudiadas con la presente Tesis Doctoral, concretamente AOH, AME y TeA.

Tabla 3. Resumen de las características analíticas de métodos descritos en la bibliografía para la determinación de AOH, AME y TeA.

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
AOH AME	Pienso	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	77.8 – 83.0	LC-MS/MS	20/n.d. 45/n.d.	142
AOH AME	Tomate Productos derivados	1) UAE: ACN/Ác. Acético 2) SPE (Oasis HLB)	97.1 – 111	HPLC-DAD-MS	3.94/n.d. 0.074/n.d.	109
AOH AME	Maíz, cacahuete, sorgo y pienso	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	66 – 93	LC-MS/MS	5/n.d. 8/n.d.	143
AOH AME	Trigo integral	1) SLE: ACN/Agua 2) SPE (Bond Elut Mycotoxin®)	8 – 101	LC-MS/MS	20/68 1 / 3	144
AOH AME	Granos de soja	1) SLE: ACN/Agua/MeOH 2) SPE (C ₁₈)	75.6 – 104.5	HPLC-DAD	8/24 16/48	107
AOH AME	Alimentos de cereales	1) SLE: MeOH 2) SPE (Aminopropilo / C ₁₈)	32 – 71	LC-MS/MS	0.37/1.1 0.13/0.43	110
AOH	Cebada	QuEChERS* ACN/Agua/Ác. Fórmico NaCl/MgSO ₄	89.8 – 94.1	LC-UHRMS	2.5 (LCL)	145
AOH AME	Almendras, avellanas, cacahuets y pistachos	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	84 – 117	LC-MS/MS	3 – 9.6 (LCL) 0.8 – 2.9 (LCL)	92
AOH AME	Maíz y trigo	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	80.8 – 81.8	LC-MS/MS	0.75/n.d. 0.1/n.d.	91

Tabla 3. Continuación.

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
AOH AME	Aperitivos a base de cacahuete y maíz	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	82.4 – 116.0	LC-MS/MS	0.4/n.d. 0.3/n.d.	108
AOH AME TeA	Albahaca, cerveza aceitunas y salsa de tomate	LLE y SLE con disoluciones tampón y MeOH	50.8 – 96.0	LC-MS/MS	620 – 8080/2080 – 29920 160 – 1380/540 – 4600 1220 – 7120/4060 – 23730	68
AOH AME	Maíz, cacahuete, soja y productos derivados	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	87 – 123	LC-MS/MS	0.005/n.d. 0.001 – 0.002/n.d.	146
AOH AME TeA	Trigo	SLE: ACN/KCl/DCM/HCl Extracción por fracciones	n.d.	HPLC-DAD	n.d./10 n.d./10 n.d./60	147
AOH AME	Bebidas	A) Inyección directa B) SPE (C_{18}) C) Evaporación / Reconstitución	80.0 – 112.9	HPLC-DAD	2 – 6/3.3 – 10 0.1 – 2/0.2 – 3.1	148
TeA	Productos de tomate y pimiento	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	91.0 – 102	LC-MS/MS (SIDA)	0.59/1.97	128
AOH AME	Tomates, pimientos, cebollas, frutos rojos y derivados del tomate	SLE: ACN/AcOEt/Ác. Fórmico	19 – 90	HPLC-MS	7.4 – 17.4/n.d. 4.7 – 90.0/n.d.	149

Tabla 3. Continuación.

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
AOH AME	Productos lácteos	QuEChERS ACN/Agua/Ác. Acético Acetato sódico/ MgSO_4 d-SPE ($\text{PSA}+\text{C}_{18}$)	87.1 – 95.2	LC-UHRMS	$\text{CC}_\alpha/\text{CC}_\beta$ 0.01/0.03 0.38/0.64	100
AOH AME	Puré de manzana, avellanas, maíz y pimiento verde	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	29 – 167	LC-MS/MS	0.5 – 9.4/1.6 – 31.2 0.1 – 0.5/0.2 – 1.7	90
AOH AME	Arroz, copos de avena y cebada	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético Hexano	98.0 – 105.4	LC-MS/MS	0.50 – 0.85/1.00 – 1.60 0.67 – 1.32/1.35 – 2.50	80
AOH AME	<i>Puerariae lobatae radix</i>	1) UAE: ACN/Agua 2) SPE (PuriTox ^{SR} TC-M160 MultiPurification)*	82.4 – 102.7	LC-MS/MS	0.214/0.998 1.06 / 4.97	111
AOH AME	Pienso	QuEChERS ACN/Agua/Ác. Fórmico $\text{NaCl}/\text{MgSO}_4$ d-SPE ($\text{MgSO}_4+\text{C}_{18}$)	76 – 110	LC-MS/MS	n.d./1-5 n.d. – 0.5 – 2.5	98
AOH AME	Vino	QuEChERS* ACN/Agua/Ác. Fórmico MgSO_4	72 – 93	LC-MS/MS	10/50	150
AOH AME TeA	Trigo	SLE: AcOEt/Agua/HCl	70.4 – 87.6	LC-MS/MS	0.75/2.5 0.1/0.3 2.5/7.5	73

Tabla 3. Continuación.

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
AOH AME TeA	Tomate	1) MeOH/DNPH 2) SPE (Strata-XL)	89.0 – 90.8	LC-MS/MS	2/5 0.3/1 10/20	132
AOH AME	Granada y zumo	QuEChERS ACN/Agua/Ác. Acético NaCl/MgSO ₄ d-SPE (PSA + MgSO ₄)	82.0 – 108.4	HPLC-DAD	20/66	97
AOH AME	Sorgo	1) SLE: ACN /Agua /Ác. Acético Hexano 2) SPE (amino)	8 – 11**	LC-MS/MS	25/50 6/12.5	81
AOH AME TeA	Alimentos a base de tomate y cítricos	1) UAE: ACN/Agua/MeOH 2) SPE (HLB)	70 – 120	LC-MS/MS	5/n.d. 0.1/n.d. 1/n.d.	83
AOH	Tomate	1) UAE: PB 2) MISPE	81 – 103	HPLC-FLD	n.d./33 (LCL)	43
TeA	Productos de tomate	QuEChERS ACN/Agua/Ác. Fórmico NaCl/MgSO ₄	102	LC-MS/MS (SIDA)	0.38/1.28	78
AOH AME	Fresas	LLE: AcOEt*	63 – 101	LC-MS/MS	0.75/1.75 2.00/3.50	69

Tabla 3. Continuación.

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
AOH AME TeA	Cereales, cítricos, manzanas, tomates y vino	QuEChERS ACN/Agua/Ác. Acético MgSO ₄	85 – 112	LC-MS/MS	n.d./2 n.d./1 – 2 n.d./5	44
AOH AME TeA	Productos de tomate y zumos de frutas y verduras	QuEChERS ACN / Agua / Ác. Acético NaCl / MgSO ₄ ó NaSO ₄	87.0 – 110.6	LC-MS/MS	3.0 – 18.3/1.1 – 61.5	103
AOH AME TeA	Fruta	1) QuEChERS ACN/Agua/Ác. Acético/NaCl 2) SPE (MCX + NH ₂)*	86.5 – 102.3	LC-MS/MS	n.d./1	101
AOH AME TeA	Vino y zumo	Cromatografía contracorriente H ₃ PO ₄ /Líquidos iónicos	81.14 – 110.94	HPLC-DAD	0.04/n.d. 0.03/n.d. 0.14/n.d.	104
AOH AME TeA	Productos de tomate, zumos, productos de panadería, aceites vegetales y semillas de girasol	SLE: ACN/Agua/Ác. Fórmico DnS	52 – 113	LC-MS/MS	0.2 – 2.8/0.6 – 9.3 0.04 – 0.4/0.1 – 1.2 3.6 – 34/12 – 110	40
TeA	Uvas	QuEChERS AcOEt/Agua/Ác. Fórmico NaCl/MgSO ₄ /CaCl ₂	82 – 97	HPLC-DAD	10/50	151

Tabla 3. Continuación.

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
AOH	Maíz	SLE: AcOEt/Agua/Ác. Acético*	60.9	LC-MS/MS	4.8 – 15.8	152
AOH AME	Productos de bayas	QuEChERS* ACN/Agua/Ác. Fórmico NaCl/MgSO ₄	74 – 105	LC-MS/MS	1.5 – 3/5 – 7 3 – 8/9 – 15	99
AOH	Trigo y zumo de frutas	SLE: ACN/Agua	113 – 125	LFIA	2.8–19.4/n.d.	137
TeA	Trigo y zumo de frutas	SLE: ACN/Agua	90 – 129	LFIA	65.3 – 126.4/n.d.	47
AOH AME TeA	Maíz y pienso	SLE: ACN/Agua/Ác. Acético DnS	63 – 200	LC-MS/MS	0.15 - 0.4/0.5 - 1.4 0.16 - 1.2/0.54 - 3.8 0.93/3.1	153
AOH AME TeA	Cereales	QuEChERS 1) ACN/Agua/Ác. Fórmico NaCl/MgSO ₄ 2A) DLLME: Agua/ACN / Cloroformo 2B) Secar y reconstituir	72.69 – 109.1	A) LC-DAD/FLD B) LC-MS/MS	A) 0.62 - 48/2.1 – 120 B) 0.1–1.8/0.4–6.1	154

* De los diferentes métodos evaluados, éste fue el que mejor resultados ofreció.

** Expresado como: 1-(relación entre la concentración calculada y la teórica).
n.d.: no descrito.

AOH: alternariol; AME: monometiléter de alternariol; TeA: Ácido tenuazónico; SLE: Extracción sólido-líquido; LLE: Extracción líquido-líquido; DnS: Dilución e inyección; LC: Cromatografía de líquidos; MS/MS: Espectrometría de masas en tándem; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; CC_α: Límite de decisión; CC_β: Capacidad de detección; LCL: Nivel mínimo de calibración; UAE: Extracción asistida con ultrasonidos; SPE: Extracción en fase sólida; PSA: Amina primaria secundaria; DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina; HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia; DAD: Detector de hilera de diodos; FLD: Detector de fluorescencia; UHRMS: Espectrometría de masa de ultra alta resolución; SIDA: Ensayo de dilución isotópica estable; LFIA: Inmunoensayo de flujo lateral; DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva.

5.2. Moléculas indicadoras de frescura

Uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta actualmente la industria agroalimentaria, ante los crecientes controles que se aplican, es incrementar la calidad y seguridad de los alimentos. El consumidor demanda calidad en términos de apariencia, frescura, presentación, oportunidad, así como valor nutritivo, sanidad e inocuidad.¹⁵⁵ Este conjunto de características se conocen como atributos de la calidad de un alimento. Entre ellos podemos incluir a los denominados atributos externos, que son aquellos apreciados básicamente a través de la vista y el tacto del consumidor. En este grupo se incluye la presentación, apariencia, uniformidad, madurez y frescura del alimento.

Dependiendo del contexto el término “frescura” puede tener una variedad de significados. En general se aplica a alimentos no procesados, por ejemplo, huevos frescos o carne fresca, indicado que no han sido modificados. Se habla también de frutas frescas cuando estas no se han congelado, desecado, enlatado o preservado en vinagre, azúcar u otros líquidos.¹⁵⁵ Por ejemplo, la leche fresca es la obtenida directamente de la vaca, que se ha sometido a un proceso térmico suave de pasteurización a 79 °C durante 17 s, inactivando o eliminando los microorganismos potencialmente peligrosos y preservando, prácticamente intactas, las propiedades nutricionales y organolépticas de la leche de origen. Por tanto, el término frescura tiene muchas aplicaciones y este apartado tiene como objetivo introducir al lector en los aspectos relacionados con las moléculas marcadoras del grado de frescura en los alimentos.

5.2.1. Concepto de frescura

La Real Academia Española de la Lengua (RAE) define la frescura como “cualidad de fresco” y fresco como “reciente, acabado de hacer o de coger”, o referido a alimentos “que no han sido sometido a procesos de congelación o conservación”. Sin embargo, en la práctica es un concepto que no se puede definir correctamente en esos términos, especialmente cuando se hace referencia a la frescura de alimentos envasados.

Aunque no sea posible definir de forma precisa la frescura de un alimento ésta se puede considerar como “la cualidad de un alimento de haber conservado sus propiedades originales a lo largo del tiempo”. Según el *Institute of Food Science &*

Technology (IFST, UK), el término frescura se aplica a los “alimentos perecederos no procesados de corta vida útil antes de que haya pruebas perceptibles de cambios físicos, químicos o microbiológicos”.¹⁵⁵

La frescura está íntimamente relacionada con el concepto de sabor. El sabor es el resultado de complejas interacciones entre los sentidos olfativo, gustativo y háptico. En la práctica, se puede considerar que el sabor se forma a partir de cuatro componentes diferentes: olor, aroma, gusto y sensación en la boca. El olor es la percepción de los volátiles por la membrana mucosa olfativa en la cavidad nasal. La experiencia del aroma se debe a la volatilización de los compuestos por el calor corporal después de tomar el producto alimenticio en la boca. El gusto es la percepción de sustancias solubles por los receptores de la boca situados en la lengua. El término sensación bucal cubre la percepción háptica del producto alimenticio en la superficie de la cavidad oral.¹⁵⁶ De hecho, el consumidor condiciona generalmente su concepto de frescura y, en general, de calidad, a la percepción de estos mismos junto al color y la textura. Es necesario dejar claro que los cambios en las propiedades organolépticas óptimas de los alimentos se deben, en definitiva, a una degradación microbiológica o nutricional del alimento derivada del paso del tiempo o de una mala conservación de éstos.^{157,158}

Una vez establecido el concepto de frescura se llega al siguiente punto de controversia: ¿Cómo se mide la frescura del alimento si se trata de un parámetro tan relativo? En todo proceso de degradación se producen reacciones químicas en las que se generan productos responsables de los cambios en las propiedades organolépticas que pueden utilizarse, en ciertas ocasiones, para monitorizar la frescura de los alimentos. Son los llamados marcadores de frescura.

5.2.2. Origen y tipos de marcadores de frescura

Los marcadores de frescura se han estudiado en profundidad, debido a las posibilidades que ofrecen a la hora de simplificar los análisis tradicionales para asegurar la calidad de los alimentos. En general se trata de moléculas generadas por diversas reacciones químicas (metabólicas) o microbiológicas que tienen lugar, tras el envasado del alimento, a medida que pasa el tiempo de almacenamiento. Estas moléculas son, en muchos casos, metabolitos producidos por la acción de los microorganismos o mediante

reacciones metabólicas que se dan en los alimentos. No obstante, estas moléculas también pueden generarse durante los diferentes tratamientos a los que somete al alimento para que presente determinados sabores o aromas y que, con el tiempo, originan compuestos no deseados. La formación de las diferentes moléculas que pueden utilizarse como marcadores de frescura depende de la naturaleza del producto envasado, del tipo de empaquetamiento y de las bacterias presentes en el medio. Para que puedan ser considerados como verdaderos marcadores, es importante verificar que dichos compuestos se forman siempre en las mismas condiciones y que inicialmente las concentraciones sean nulas o muy bajas, de manera que puedan ser trazados desde el instante de máxima frescura.¹⁵⁹

Dada la diversidad de procesos bioquímicos que se producen en los alimentos, los metabolitos con potencial para su empleo como marcadores de frescura son diversos, como se muestran en la Tabla 4.

A continuación se describen, en mayor detalle, aquellos compuestos incluidos en la Tabla 4 para los que se ha demostrado su validez como marcadores de frescura, como es el caso de la hipoxantina (derivado de ATP), el furfural y el hidroximetilfurfural (aldehídos volátiles) y las aminas biogénicas.

5.2.2.1. Hipoxantina

Tras el sacrificio del animal se inician diversas reacciones *post mortem* que afectan a la calidad y frescura de la carne. Uno de los cambios más importantes se produce debido a la degradación de la adenosina 5'-trifosfato (ATP), a través de una serie de reacciones de defosforilación y desaminación, a diferentes compuestos que se conocen como productos de la degradación del ATP. La secuencia de degradación es la siguiente (Figura 12): el ATP se degrada a adenosina 5'-difosfato (ADP) y posteriormente en adenosina 5'-monofosfato (AMP). Seguidamente una desaminasa hidroliza el grupo amino de la molécula y produce inosín 5'-monofosfato (IMP). El IMP es hidrolizado por enzimas autolíticas (5'-IMPasa) a inosina que, a su vez, se degrada a hipoxantina por acción autolítica y/o microbiana (purina nucleósido fosforilasa). A continuación, la hipoxantina se oxida a xantina y, posteriormente, a ácido úrico mediante una reacción mucho más lenta, catalizada por la xantina oxidasa en el caso de degradación por

microorganismos. Esta degradación tiene lugar en productos de origen animal, tales como el pescado o la carne de vacuno, pollo o cerdo. Es por ello que algunos de los metabolitos mencionados anteriormente se han propuesto como marcadores de frescura para asegurar la calidad de dichos alimentos.¹⁶¹

Tabla 4. Marcadores de frescura y principales productos donde encontrarlos.^{159,160}

Marcador	Alimento
Etanol	Marisco Productos frescos
Ácidos orgánicos	Pescado fresco Carne Aves
Glucosa	Carne
Compuestos volátiles de nitrógeno	Marisco
Aminas biogénicas	Aves Vacuno Cerdo
Dióxido de carbono	Indicador de crecimiento bacteriano en múltiples alimentos
Productos de degradación de ATP	Carnes Mariscos
Compuestos sulfúricos	Aves Marisco
Aldehídos volátiles	Bebidas Productos de panadería Miel
Volátiles no definidos	Carne
Enzimas microbiológicas	Diversos
Bacterias patógenas	Diversos

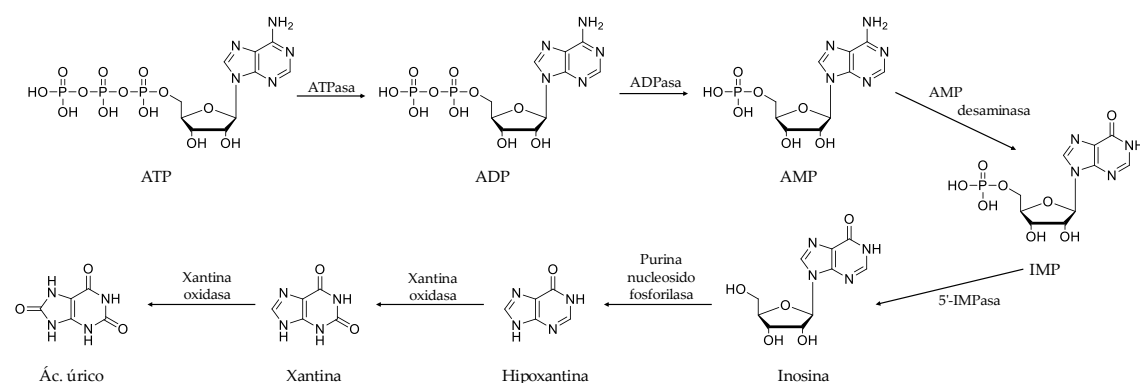


Figura 12. Esquema del mecanismo de degradación del ATP.

Habitualmente se emplea solo la hipoxantina como marcador de la frescura del alimento, sin embargo, se ha comprobado que la monitorización de todos los productos de degradación del ATP permite un mayor control de este parámetro.

Así, existen diversos valores o índices de calidad (Tabla 5) que relacionan dichos productos de degradación con la frescura de alimento, en función de sus diferentes velocidades de formación. De todos ellos, el índice de calidad K (en inglés *k value*) es el más utilizado para evaluar la frescura del pescado.¹⁶²

Tabla 5. Ecuaciones que relacionan los productos de degradación del ATP para su empleo como marcadores de frescura.^{163,164}

Índice de calidad	Ecuación
K	$\frac{\text{HxR} + \text{Hx}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx}} \cdot 100$
Ki	$\frac{\text{HxR} + \text{Hx}}{\text{AIMP} + \text{HxR} + \text{Hx}} \cdot 100$
H	$\frac{\text{Hx}}{\text{AIMP} + \text{HxR} + \text{Hx}} \cdot 100$
P	$\frac{\text{HxR} + \text{Hx}}{\text{AMP} + \text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx}} \cdot 100$
Fr	$\frac{\text{IMP}}{\text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx}} \cdot 100$
G	$\frac{\text{HxR} + \text{Hx}}{\text{AMP} + \text{IMP} + \text{HxR}} \cdot 100$
F	$\frac{\text{Ao} + \text{Ai} + \text{HxR} + \text{Hx}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx} + \text{Ao}} \cdot 100$

Todos los valores se expresan como porcentaje.

HxR: Inosina; Hx: Hipoxantina; ATP: adenosina 5'-trifosfato; ADP: adenosina 5'-difosfato; AMP: adenosina 5'-monofosfato; IMP: inosina 5'-monofosfato; Ao: Adenosina; Ai: Adenina.

Todos estos productos de degradación tienen gran influencia en el sabor de los alimentos carnosos. La degradación de inosina a hipoxantina está asociada con el sabor amargo. En general, la presencia de hipoxantina se correlaciona de forma negativa con la calidad, mientras que la inosina y la IMP están correlacionadas positivamente con la frescura, estando en muchos casos conectados con el sabor de la carne y el pescado frescos. De hecho, la concentración de IMP en el alimento está directamente vinculada a su buen sabor, relacionándose la degradación de esta molécula y la aparición de hipoxantina con la pérdida de la calidad. De acuerdo con estas observaciones, y considerando que su velocidad de formación es bastante uniforme, la presencia de hipoxantina proporciona información sobre la degradación del alimento durante el almacenamiento temprano, alcanzando un valor máximo alrededor de 8 días.^{165,166}

Por todo lo comentado anteriormente, se puede concluir que la formación *post mortem* de hipoxantina en el músculo del animal se correlaciona con la frescura de la carne, incluso antes de la invasión microbiológica de los tejidos, pudiendo considerarlo como un importante marcador de frescura,¹⁶⁷ como ya se viene haciendo desde mediados del siglo pasado hasta nuestros días.^{168,169}

5.2.2.2. Furfural e hidroximetilfurfural

En muchos casos, los alimentos se procesan antes de su comercialización para extender su vida útil facilitando que lleguen al mercado con la calidad adecuada. No obstante, en algunas ocasiones el objetivo del procesado no es la conservación, sino la mejora de algunas de las características organolépticas del producto, ya que se generan aromas, colores o sabores característicos del producto. Estos procedimientos, así como las condiciones de almacenamiento del alimento, pueden dar lugar a una pérdida en la calidad nutricional debido, por ejemplo, a la destrucción de aminoácidos esenciales o a la producción de compuestos tóxicos o con baja calidad nutricional.

Una de las reacciones que tienen lugar durante el procesado y almacenado de ciertos alimentos es la reacción de Maillard.^{170,171} Se trata de una reacción de pardeamiento no enzimático producida por azúcares reductores, principalmente D-glucosa, y un aminoácido libre o un aminoácido que forma parte de una cadena proteica. Los productos de la reacción de Maillard contribuyen de manera importante al

sabor y al olor de los alimentos.¹⁷² Esto se debe a que en dicha reacción se generan, entre otros, aldehídos volátiles responsables, en gran medida, de las características organolépticas del producto. Cabe resaltar que el sabor y olor generados dependen del azúcar y el aminoácido de partida, dado que el producto obtenido va a ser diferente.

Es necesario mencionar que la reacción de Maillard no es un proceso contraproducente o no deseado ya que juega un papel fundamental en la industria de los sabores y los aromas, siendo la responsable de procesos industriales importantes como, por ejemplo, la caramelización. El problema radica en que la reacción progresa continuamente hasta la generación de compuestos no deseados. De los distintos aldehídos que se pueden formar, los más utilizados como marcadores de frescura son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), dado que su concentración aumenta linealmente con el envejecimiento y la degradación paulatina del sabor y color de los alimentos. La aparición de estos compuestos depende de la composición de los alimentos y del tiempo y la temperatura de procesado, aumentando sobre todo cuando se aplican altas temperaturas.¹⁵⁶ En la Figura 13 se muestra un esquema en el que se representa la formación de furfural y HMF a partir de la reacción de Maillard.

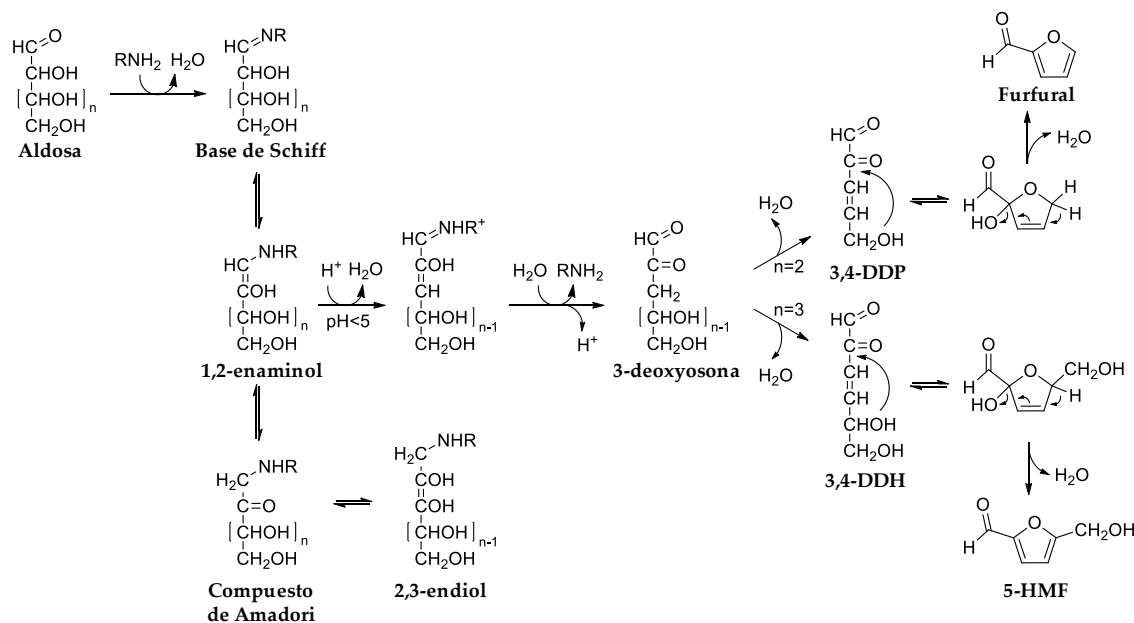


Figura 13. Esquema de la reacción de Maillard, incluyendo la formación de α -dicarbonilos, furfural y 5-HMF, a partir de una pentosa (n = 2) y/o una hexosa (n = 3). (3,4-DDP: 3,4-didesoxipentosuleno-3-eno; 3,4-DDH: 3,4-didesoxihexosulosa-3-eno; 5-HMF: 5-hidroximetilfurfural). Adaptado de la referencia 156.

Como se ha comentado anteriormente, esta reacción está favorecida por el calentamiento a elevadas temperaturas durante el procesado de estos de alimentos, especialmente tras la caramelización. Dentro de este grupo podemos destacar la miel,¹⁷³ los productos de panadería¹⁷⁴ y diversas bebidas.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷

5.2.2.3. Aminas biogénicas

Las aminas biogénicas o biógenas se consideran marcadores de frescura dado que son productos de degradación de muchas reacciones en los alimentos. Estas aminas se generan a partir de reacciones enzimáticas de aminoácidos específicos, debido a la actividad endógena de los tejidos o la actividad microbiológica, siendo este último un proceso complejo dadas las diferentes reacciones enzimáticas que implica. Se trata de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que se forman a partir de la descarboxilación de algunos aminoácidos durante el almacenamiento de los alimentos. Son especialmente frecuentes en alimentos con un elevado contenido proteico.¹⁷⁸ Las aminas más comunes encontradas en carnes son la triptamina, la putrescina, la cadaverina, la serotonina, la tiramina, la espermidina y la espermina; mientras que en pescados son la trietilamina y la dimetilamina. Una gran ventaja a la hora de emplear este tipo de compuestos como marcadores de frescura es que son térmicamente estables. Sin embargo, su presencia o ausencia no puede considerarse un criterio absoluto, ya que pueden degradarlas ciertos microorganismos. Es importante resaltar que este tipo de compuestos también puede ejercer algunos efectos adversos sobre la salud tales como desorden en los neurotransmisores, dolores de cabeza, náuseas o palpitaciones.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰

Mientras que los productos de degradación del ATP son productos de la actividad autolítica y están exclusivamente relacionados con la degradación propia del alimento, las aminas biogénicas están relacionadas con la acción bacteriana, lo que las convierte en indicadores de las últimas etapas de degradación.¹⁶⁶

5.2.3. Métodos de análisis de marcadores de frescura

Tradicionalmente, la frescura de los alimentos se ha determinado empleando ensayos organolépticos, realizados por personas entrenadas y formadas para ello, evaluando parámetros previamente establecidos como el color o el olor. Estos métodos, en principio, permiten una evaluación inmediata de la calidad y pueden realizarse sin

dañar la muestra. No obstante, el mayor problema de las inspecciones humanas es la parcialidad, incluso cuando se habla de personal con experiencia y bien entrenado. Además, es difícil para los expertos realizar una evaluación sensorial cuantitativa, es decir, indicar no solo la presencia de ciertos compuestos sino también la cantidad a la que estos se encuentran en el alimento. Es por ello que se necesitan métodos de análisis, independientes de la subjetividad humana, que permitan determinar los marcadores de frescura indicados anteriormente, para satisfacer los criterios de calidad demandados por la industria agroalimentaria.

Las matrices de los alimentos suelen ser complejas por lo que, en la mayoría de los casos, es necesario incluir una etapa de limpieza y preconcentración de muestra, previa al análisis, para evitar el efecto matriz. En general, los marcadores de frescura suelen analizarse empleando métodos cromatográficos, con o sin derivatización previa, como se describe a continuación.

5.2.3.1. Análisis de hipoxantina y otros metabolitos de ATP

La hipoxantina no suele determinarse de forma aislada sino en combinación con otros metabolitos resultantes de la degradación del ATP. El método más utilizado para este análisis es el desarrollado por Burns y col. que incluye una extracción con ácido perclórico, seguida de una etapa de neutralización con base tras centrifugar y filtrar, y análisis mediante HPLC con detección UV-VIS.¹⁸¹

Además de los métodos basados en cromatografía de líquidos se han puesto a punto otros que permiten el análisis rápido y no invasivo de las muestras. Por ejemplo, se ha utilizado la técnica de imagen hiperespectral¹⁸² y las matrices excitación-emisión¹⁸³ correlacionando las señales ópticas con el índice de calidad K (*k value*, Tabla 5), calculado mediante HPLC-DAD. La aplicación del análisis multivariante hace posible analizar las imágenes de las diferentes muestras y evaluar la progresión de la degradación por zonas, en función de dicho índice de calidad.

En un intento por mejorar la extracción y análisis de hipoxantina se ha desarrollado un MIP, empleando teofilina como molécula plantilla, para la determinación selectiva de hipoxantina e inosina en muestras de merluza mediante

cromatografía de líquidos de ultra eficacia acoplada a un detector de matriz de fotodiodos (UPLC-PDA).¹⁶¹

Una alternativa a los métodos cromatográficos para la determinación de hipoxantina son los biosensores. Estos dispositivos permiten una medición rápida de la concentración del analito en muestras de pescado o carne evitando, en muchos casos, el tratamiento de muestra. Por lo general se trata de biosensores electroquímicos, amperométricos o potenciométricos, basados en la reacción catalizada por la xantina oxidasa en la que la hipoxantina se transforma en xantina, con liberación de peróxido de hidrógeno que se monitoriza por vía electroquímica. Alternativamente han desarrollado biosensores utilizando combinaciones de enzimas, o materiales compuestos, que mejoran la sensibilidad de los dispositivos basados en xantina oxidasa, aunque sigue siendo necesario rebajar los límites de detección.¹⁸⁴

5.2.3.2. Análisis de furfural e hidroximetilfurfural

El furfural y el HMF son aldehídos volátiles con un olor característico por lo que, en general, no se analizan de forma aislada sino en combinación con otros compuestos responsables de los aromas en los alimentos. No obstante, en muchos casos si que se determina la variación de su concentración con el tiempo, aunque no se relacione propiamente con la frescura del alimento.

Como ya ocurría en el caso de la hipoxantina, el furfural y el HMF se suelen analizar mediante cromatografía acoplada a diversos detectores. Por ejemplo, se ha descrito su análisis en muestras de leche de fórmula mediante HPLC con detección UV-VIS, evaluándose la variación de su concentración en función del tiempo y la temperatura de almacenaje.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ En estos trabajos no se evalúa únicamente el contenido libre de los derivados de furfural sino también el contenido total o potencial de los mismos, es decir, los generados a partir de precursores (aminoácidos, azúcares reductores y compuestos de Amadori), aplicando un tratamiento térmico previo a la extracción. El fin de este estudio es evaluar correctamente la aparición de este tipo de compuestos en leches infantiles con diferentes composiciones (variaciones en azúcares, vitaminas, minerales y proteínas) y en las distintas condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura). Estos parámetros han demostrado tener una gran influencia en

la formación de moléculas derivadas del furfural, en especial el contenido de lisina y compuestos de Amadori y la temperatura de almacenaje. Sin embargo, e independientemente de los factores analizados, en todos los casos se ha establecido una relación clara entre el tiempo y la temperatura de almacenamiento y el incremento en la concentración del furfural y el HMF, demostrando su utilidad como marcadores de frescura.

Alternativamente, se ha llevado a cabo la determinación de furfural y HMF mediante derivatización previa con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). El producto obtenido, de color amarillento, se analiza mediante HPLC-VIS.¹⁷⁶ Este método se ha aplicado, por ejemplo, a la determinación de HMF en muestras de tequila empleando análisis de componentes principales, para diferenciar entre licores puros o mezclados en función del contenido de HMF en las muestras.¹⁷⁵ De igual manera, pero sin necesidad de derivatizar, se ha analizado el contenido de HMF en muestras de pekmez, un jarabe típico en las cocinas del mediterráneo oriental elaborado a partir de zumo de manzana, tras una extracción previa con acetato de etilo. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento térmico del alimento favorece la generación de estos compuestos y el incremento de su concentración a lo largo del tiempo.¹⁸⁸ Perestrelo y col. han descrito el análisis de furfural y HMF en muestras de vinos secos y dulces empleando microextracción con sorbentes empaquetados y UPLC-PDA.¹⁸⁹ Al igual que en los casos anteriores se demuestra que la concentración de ambos aldehídos aumenta con el tiempo de almacenamiento de los vinos.

Dado que se trata de compuestos volátiles, tanto el furfural como el HMF pueden analizarse mediante cromatografía de gases (GC) acoplada a distintos detectores, siendo el más utilizado ha sido el de espectrometría de masas (GC-MS). Para la extracción se puede emplear la técnica de espacio de cabeza combinada con la microextracción en fase sólida (HS-SPME, del inglés *headspace solid phase microextraction*).¹⁹⁰ La GC se ha empleado también en combinación con diversos agentes derivatizantes tales como la *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PFBHA)¹⁹¹ o la *N,o*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA),¹⁹² que dan lugar a la formación de oximas a partir de los aldehídos. No obstante, el método más empleado es HS-SPME-GC-MS con derivatización en fibra utilizando PFBHA. Este método ha permitido evaluar

la variación del contenido de determinados aldehídos volátiles, entre ellos el furfural, durante el almacenamiento de muestras de cerveza, lo que demuestra la posibilidad de utilizar este parámetro como marcador de frescura.^{177,193} De hecho, este método se ha aplicado al estudio de la variación de la concentración de furfural en cerveza tras 100 años de almacenamiento, confirmándose un notable incremento del contenido de este compuesto respecto a una cerveza fresca.¹⁹⁴ A pesar de que la reacción de derivatización se suele hacer en la fibra, Saison y col. han demostrado que el análisis de furfural en cerveza es más sensible cuando éste se lleva a cabo en disolución, obteniéndose límites de detección más bajos y confirmando las diferencias encontradas entre la cerveza fresca y la envejecida.¹⁹⁵

En los últimos años los métodos desarrollados para el análisis de furfural y HMF evitan el uso de derivatizantes y las determinaciones se llevan a cabo mediante HS-SPME-GC-MS. Como ya se ha comentado anteriormente, en la mayoría de los casos se evalúan las variaciones en el aroma de los alimentos sometidos a diferentes tratamientos y al paso del tiempo. Por ejemplo, se ha evaluado el efecto de la luz durante el almacenamiento en la aparición de este tipo de compuestos en muestras de zumo de piña;¹⁹⁶ las alteraciones debidas a la oxidación en muestras de almendras tostadas, aunque en este caso se ha comprobado que el contenido de furfural no se puede relacionar directamente con la ranciedad;¹⁹⁷ o los cambios que se producen en pimientos y especias tratados y secados empleando diversos procedimientos, observándose un incremento en el contenido de estos aldehídos en muestras que han sido calentadas durante el procesamiento.¹⁹⁸ Otro ejemplo interesante es el estudio del efecto de la implementación de selenio en muestras de arroz germinado. Cuando en el sustrato del arroz se añade Se, éste se incorpora a las proteínas durante la germinación, de forma que éstas presentan efecto antioxidante. Mediante el uso del análisis de componentes principales se ha comprobado que los germinados de arroz enriquecidos con Se generan, con el tiempo, menor cantidad de aldehídos volátiles que los correspondientes germinados no enriquecidos.¹⁹⁹ La técnica HS-SPME también se ha utilizado para evaluar la influencia del tipo de envase y las condiciones de conservación del alimento, por ejemplo evaluando la formación de aldehídos volátiles en muestras de salsa de tomate y en aceitunas en función del envase utilizado.^{200,201}

En algunos casos las mejoras en los métodos de análisis de furfural y HMF se logran modificando el método de extracción de los analitos, de forma que éste sea mucho más eficaz. Pico y col. han descrito un método basado en extracción Soxhlet con disolventes orgánicos en presencia de la enzima lipasa, que facilita la hidrólisis de las grasas, mejorando la eficiencia de extracción de los aldehídos volátiles en muestras de pan rallado. Además, estos autores han evaluado como afecta la congelación a la conservación del producto observándose una pérdida de aldehídos volátiles, y por lo tanto del aroma, aunque no se ha encontrado una correlación con la frescura del alimento.^{202,203}

Se han descrito otros métodos para el análisis de estos compuestos sustituyendo la fibra de SPME por otro tipo de sorbentes. Por ejemplo, se han empleado barras agitadoras funcionalizadas y posterior análisis mediante GC-MS de furfural, entre otros componentes volátiles, para evaluar los cambios de sabor producidos en el té helado en función del tiempo.²⁰⁴ La alternativa al empleo de fases sorbentes es el uso directo del espacio de cabeza, empleando por ejemplo la técnica de purga y trampa (PT-GC-MS). Esta técnica se ha utilizado para el análisis de los componentes volátiles de zumos de tomate frescos y cocinados, demostrándose de nuevo la influencia de la temperatura sobre el aumento de la concentración de furfural.²⁰⁵ Alternativamente, se puede usar la trampa en espacio de cabeza (HS-trap-GC-MS) que ha permitido estudiar el efecto del tiempo de horneado y los ingredientes utilizados en el cocinado de bizcochos, mejorando el método de determinación de furano y furfural mediante dilución isotópica.²⁰⁶

En la Tabla 6 se resumen algunos de los métodos recogidos en la bibliografía para la determinación de furfural en diferentes muestras de alimentos. En la mayoría de estos artículos se describe tanto el análisis de furfural como de otros compuestos relacionados, no obstante, en la tabla solo se recogen las características analíticas de los métodos aplicados al análisis de furfural e HMF.

Tabla 6. Resumen de las características analíticas de métodos descritos en la bibliografía para la determinación de furfural y HMF.

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
Furfural HMF	Leche maternizada	Adición de ác. oxálico y TCA y centrifugación Filtrado	93 101	HPPLC-UV/VIS	133 / n.d. 67 / n.d.	185,186
Furfural HMF	Leche maternizada	Adición de ác. oxálico y TCA y centrifugación Filtrado	96.24 96.32	HPPLC-DAD	3.2 / 151.7 320.7 / 490.5	187
HMF	Tequila	Derivatización con DNPH Extracción con hexano	103	HPPLC-UV/VIS	11 / 34	175
HMF	Miel	SPE Derivatización con BSTFA	n.d.	GC-MS	12 / 39	192
Furfural HMF	Cerveza	HS-SPME Derivatización en fibra y en disolución con PFBHA	n.d.	GC-MS	0.66 / 2.2 (F sol) 6.0 / 20.0 (F fibra) 310 / 1000 (HMF sol) 6000 / 20000 (HMF fibra)	195
Furfural	Cerveza	HS-SPME Derivatización en fibra con PFBHA	92 – 102	GC-MS	1.60 / 5.20	193
Furfural	Leche maternizada Vinagre	HS-SPME Derivatización en fibra con PFBHA	n.d.	GC-MS	8.24 / n.d. 14.05 / n.d. 3.09 / n.d.	191

n.d.: no determinado

HMF: Hidroximetilfurfural; TCA: Ácido tricloroacético; DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina; SPE: Extracción en fase sólida; BSTFA: *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida; PFBHA: *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina; HD-SPME: Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza; HPPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia; UV/VIS: Ultravioleta/Visible; MS: Espectrometría de masas; DAD: Detector de hilera de diodos; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

Una alternativa a las técnicas de análisis cromatográfico es el empleo de sensores que permitan la monitorización rápida y sencilla de los marcadores de frescura. En este sentido, se han desarrollado matrices de sensores colorimétricos para la determinación de aldehídos y cetonas, en fase vapor, en muestras de diversa índole para su aplicación en el campo alimentario, sanitario y de la seguridad en general. Entre los compuestos analizados se encuentra el furfural, para el que se ha descrito un límite de detección de $0.43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los sensores se han aplicado al análisis de cerveza, demostrando su potencial para el desarrollo de dispositivos de control de frescura. Por otro lado, también se han sintetizado materiales poliméricos para la determinación selectiva de furfural, en muestras de cerveza, basados en la reacción de Stenhouse, alcanzando límites de detección de $12 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.²⁰⁷

5.2.3.3. Análisis de aminas biogénicas

Las aminas biogénicas generalmente se determinan empleando cromatografía de líquidos. Eerola y col. han descrito un método para la determinación de estos compuestos basado en una extracción con ácido perclórico, seguido de neutralización y derivatización con cloruro de dansilo, previa al análisis mediante LC-UV/VIS. El método desarrollado se ha aplicado al estudio de la variación de la concentración de aminas biogénicas en función de las condiciones de conservación del alimento.²⁰⁸ Se ha descrito la monitorización de las aminas biogénicas como marcadores de frescura para evaluar las diferencias existentes entre la irradiación o el ahumado sobre el tiempo de conservación de diferentes pescados;²⁰⁹ la eficiencia de la conservación del cerdo exportado en función de la temperatura y el tiempo de congelación durante su transporte;²¹⁰ comparación de temperaturas de conservación de cangrejos;²¹¹ determinación de las aminas biogénicas en muestras para la fabricación de surimi²¹² o la influencia de la temperatura de curado en muestras de bonito salado.²¹³

A pesar de que la derivatización es habitual en el análisis de las aminas biogénicas, hay muchos trabajos en los que se describe su análisis sin recurrir a agentes derivatizantes, aunque siguen manteniendo la etapa de extracción en medio ácido. Por un lado, se ha descrito el uso de la isotacoforesis capilar aplicada al análisis de aminas biogénicas en muestras de carne, a las que se les habían añadido diversos aditivos, en

función del tiempo de almacenamiento. El uso de esta técnica, basada en los cambios de conductividad que produce cada una de las aminos, permite demostrar la eficiencia de determinados aditivos en la inhibición de la producción de estos compuestos y su relación con el crecimiento bacteriano.²¹⁴ Por otro lado, el uso de HPLC-MS/MS ha permitido analizar aminos biogénicos sin derivatización previa. Esta técnica se ha utilizado para el análisis de estos marcadores en muestras de alimentos aplicando diferentes técnicas de extracción, como pueden ser la extracción por pares iónicos utilizando fosfato de bis(2-etilhexilo) (BEHPA) en muestras de regaliz,²¹⁵ o la extracción con ácido tricloroacético (TCA) y posterior limpieza utilizando cartuchos de SPE en muestras de carne.²¹⁶

De manera similar al caso de la hipoxantina, se han desarrollado métodos de análisis basados en imagen que han permitido la determinación y evaluación de las aminos biogénicos, en alimentos, de forma no destructiva. El empleo de la técnica de imagen hiperespectral, combinada con técnicas quimiométricas, permite estudiar la generación de las diferentes aminos biogénicos e, incluso, desarrollar modelos de predicción basados en el contenido total de aminos en muestras de cerdo y pescado.^{217,218}

Alternativamente a las técnicas de análisis cromatográfico, se han descrito otros métodos para el análisis de aminos biogénicos como los ensayos ELISA. Por ejemplo, se ha diseñado un ensayo competitivo para la determinación de tiramina, considerada un marcador de frescura en alimentos de alto contenido proteico, como carne y marisco.²¹⁹

Otra alternativa a las técnicas cromatográficas es el uso de sensores, dada la posibilidad que ofrecen de realizar análisis rápidos, sencillos, no destructivos y baratos para evaluar la frescura. Se ha descrito la fabricación de un sensor plasmónico refractométrico basado en nanopartículas de oro y plata depositadas sobre papel para la detección de las aminos biogénicos en alimentos en mal estado.²²⁰ Este sistema permite detectar dichos compuestos a niveles inferiores a los establecidos en la legislación, demostrando el gran potencial y aplicabilidad de los sensores basados en nanopartículas y papel. Por otro lado, los sensores colorimétricos presentan un valor añadido a las características previamente mencionadas, ya que en ocasiones es posible detectar los cambios de color a simple vista, una ventaja para los análisis *in situ*. Un ejemplo

interesante es el descrito por Lin y col. que han desarrollado un sistema de detección de aminas biogénicas, basado en nano hilos de oro y plata, que permite la evaluación de la frescura de manera visual.²²¹ El mecanismo de sensado se basa en la hidrólisis del monoacetato de resorcinol en presencia de las aminas biogénicas. El producto de la reacción, en presencia de los iones Ag(I) de la disolución, da lugar a la deposición de Ag. La concentración de Ag depositada sobre los nanohilos, y con ello el color de la disolución, depende de la concentración de aminas de la muestra. Este sistema, incorporado en hidrogeles de agarosa, se ha utilizado para monitorizar el deterioro de salmón a lo largo del tiempo, en diferentes condiciones de almacenamiento.

5.2.3.4. Perspectivas para el análisis de marcadores de frescura

A pesar de la gran diversidad de métodos que existen para la determinación de los diferentes marcadores de frescura, la tendencia común en los últimos años es el desarrollo de metodologías más sencillas, accesibles, rápidas y económicas. Cada día se ponen a punto una gran variedad de soluciones técnicas para incrementar el valor añadido del producto, entre las que se encuentran las etiquetas inteligentes y los sensores, especialmente los colorimétricos, que suponen una alternativa atractiva para evitar los problemas asociados a las técnicas tradicionales de medida de la frescura de los alimentos. Estos dispositivos tienen la particularidad de que los cambios de señal pueden medirse a simple vista, o bien utilizando espectrofotómetros portátiles e incluso la cámara digital de los smartphones. Por otra parte, su coste suele ser reducido, lo que facilita su accesibilidad a un mayor número de usuarios. En relación a las etiquetas inteligentes, éstas permiten monitorizar el producto de forma que el envase va más allá de su función de simple contenedor y protector del producto envasado y permiten una mayor interacción con el consumidor. En resumen, el uso de sensores y, en concreto, de etiquetas inteligentes, permite conocer si un alimento es apto o no para su consumo o ha sufrido alguna alteración o deterioro, lo que facilita extender su ciclo de vida, mejorar su seguridad y evitar el despilfarro de comida.

5.3. Desarrollo de envases activos y envases inteligentes

En los últimos años, los sistemas de envasado de alimentos han experimentado una evolución importante, en respuesta a las exigencias de los consumidores relativas a la calidad, seguridad e inocuidad de los productos. El envase, además de cumplir con sus funciones habituales se está convirtiendo en una vía para interaccionar con su contenido o bien, para registrar información relevante tanto para los distintos actores que participan en la cadena de valor como para el consumidor final. En este sentido, hay dos tecnologías en auge que han encontrado en los envases sus principales campos de aplicación, concretamente el desarrollo de materiales activos y el desarrollo de materiales inteligentes.

El envase activo está diseñado para “controlar” los factores responsables de la alteración del producto envasado. Normalmente, están diseñados para interactuar activamente con el producto o el entorno que les rodea, manteniendo o mejorando la calidad y la seguridad de los alimentos, así como para aumentar la vida útil de los mismos durante su almacenamiento.²²² El envase inteligente es un sistema que permite monitorizar las condiciones del producto envasado, aportando información sobre su calidad y sobre el estado del envase durante toda la cadena de suministro, incluyendo el transporte o el almacenamiento del mismo. A diferencia de los materiales activos, los materiales inteligentes no actúan directamente incrementando la vida útil del alimento, aunque si son útiles para verificar la efectividad de los envases.²²³

Aproximadamente, un 25% de los costes fuera de fábrica de los alimentos dedicados al consumo humano corresponde a los gastos de envasado, por lo que la búsqueda de nuevos materiales funcionales que permitan una reducción de costes con un impacto ambiental mínimo son una prioridad en la industria alimentaria. La obtención de estos materiales requiere de la colaboración de expertos en diferentes disciplinas como la química, la microbiología, la ciencia de los alimentos o la ingeniería, entre otros.²²⁴

Esta sección está dedicada a los envases activos, ya que éstos han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. Como se ha indicado anteriormente, los materiales utilizados para esta aplicación han despertado gran interés, tanto en la industria

alimentaria como entre los consumidores, por sus implicaciones en el incremento de la vida útil de los alimentos, su calidad, seguridad o inocuidad y en sus características sensoriales.

5.3.1. Envases activos. Aplicación como sistemas de liberación controlada

El reglamento (CE) nº 1935/2004 *sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos* define a los materiales y objetos activos en contacto con alimentos como “materiales y objetos destinados a ampliar el tiempo de conservación, o a mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados, y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmitan sustancias a los alimentos envasados, o al entorno de éstos, o que absorban sustancias de los alimentos envasados o del entorno de éstos”.²²⁵

Posteriormente, los diversos avances realizados en este campo hicieron necesaria una definición más precisa de los componentes empleados en el desarrollo de envases activos, publicándose el reglamento (CE) nº 450/2009 *sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos*. Este reglamento define como materiales y objetos activos “los destinados a prolongar la vida útil o a mantener o mejorar el estado del alimento envasado. Están diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberarán sustancias en el alimento envasado o en su entorno o absorberán sustancias del alimento o de su entorno”.²²⁶ De esta manera se introduce el concepto de liberación de sustancias al alimento o al medio, lo que favorece que se alargue la vida útil del mismo. Este reglamento, a su vez, incluye la definición de materiales activos liberadores, “materiales diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberarán sustancias en el alimento envasado, en su superficie o en su entorno”, y el de sustancias activas liberadas, “sustancias destinadas a ser liberadas en el alimento envasado, en su superficie o en su entorno por materiales y objetos activos liberadores y que cumplen un propósito en el alimento”.

A este respecto, es necesaria la búsqueda de nuevos materiales de envasado que dañen lo menos posible al medio ambiente y que, por otra parte, no afecten a las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos. Por ejemplo, en los últimos años se ha trabajado en la preparación de materiales activos que integran agentes para

prevenir el crecimiento de microbios extendiendo la vida útil del producto, disminuyendo los recuentos en vivo de microorganismos y reduciendo su tasa de crecimiento.²²⁷ Los agentes seleccionados para su empleo en alimentos deben estar aprobados por las agencias autorizadas (*p.e. Food and Drug Administration, FDA, EFSA, etc.*) dependiendo del país, identificándose como compuestos que pueden ser aplicados a determinadas concentraciones para mejorar o preservar la inocuidad de los alimentos.²²⁸ Entre los materiales utilizados con este fin se encuentran biopolímeros basados en lípidos, proteínas, polisacáridos o en combinaciones de los mismos. Este tipo de materiales orgánicos biocompatibles evitan los problemas de seguridad asociados al empleo de materiales sintéticos, como se comentará posteriormente.²²⁹

El desarrollo de materiales para la fabricación de envases activos debe tener en cuenta los procesos de transferencia de masa y las interacciones entre los alimentos y los materiales de los envases. Estas interacciones se pueden dividir en procesos individuales, que pueden aparecer simultánea o parcialmente en cada caso. Estos procesos incluyen migración de componentes del material a los alimentos, sorción y desorción de compuestos volátiles, cambios en el contenido de humedad del alimento, permeación de gases y posible degradación de los alimentos causada por agentes externos (Figura 14).²³⁰ Es necesario estudiar cuidadosamente cada uno de estos procesos físico-químicos a la hora de diseñar y desarrollar nuevos sistemas de envasado más allá de los materiales convencionales, basados en la mera protección del producto.

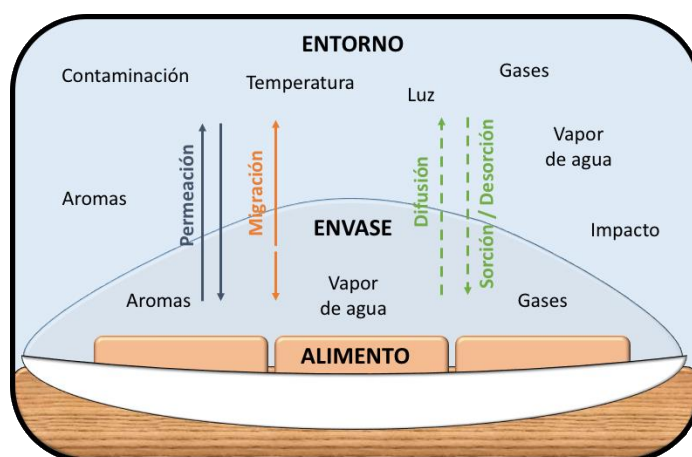


Figura 14. Esquema de los procesos de interacción entre los envases de alimentos y el entorno.

5.3.1.1. Clasificación de los envases activos

Los envases activos se pueden clasificar en dos grupos principales: envases activos no migratorios y envases activos de liberación controlada. A grandes rasgos, se incluyen en el primer grupo los envases que actúan sin que se produzca una migración intencionada de componentes hacia el alimento; mientras que en el segundo grupo se incluyen aquellos materiales en los que se produce la liberación de ciertos componentes, bien a la atmósfera del producto, o directamente sobre los alimentos.²²²

Como se ha indicado anteriormente, los envases activos no migratorios originan una respuesta en el alimento sin afectar de manera directa al entorno o al producto. Los ejemplos más conocidos son aquellos basados en la absorción de agua o de oxígeno para evitar la oxidación de los alimentos.²³¹ No obstante, también es posible evitar el deterioro del producto sin afectar directamente a los componentes responsables del mismo, como por ejemplo, evitar la oxidación sin modificar directamente al contenido de oxígeno, es decir, reaccionando o atrapando otras moléculas o elementos que puedan dar lugar a la oxidación de alimento. Este es el caso de los envases con películas poliméricas basadas en polipropileno y ácido acrílico, las cuales actúan capturando iones metálicos, en especial iones de hierro, responsables de la oxidación lipídica.²³²

Si bien los envases no migratorios alargan la vida útil de los alimentos, en ocasiones se requieren acciones más activas que la simple captura de radicales libres, o de componentes que promuevan la oxidación lipídica. En este sentido se han desarrollado materiales para la fabricación de envases activos de liberación controlada que, como su nombre indica, participan activamente en el mantenimiento de las condiciones óptimas de almacenamiento para la adecuada conservación del alimentos, así como de sus óptimas propiedades organolépticas y nutricionales. Por lo general, el mecanismo de control de estos materiales se suele basar en la difusión de los componentes activos manteniendo una concentración constante de los mismos durante un periodo de tiempo.²²⁷

Este tipo de envases ofrece mayor versatilidad para su aplicación que los envases activos no migratorios, dado que es posible seleccionar el agente activo más conveniente en función del efecto buscado y del alimento a conservar. Por ejemplo, si se desea evitar

o retardar la oxidación, lo más común es añadir antioxidantes²³³ pero, si lo que se busca es inhibir el crecimiento bacteriano, los componentes a liberar serían antimicrobianos o sustancias que actúen como tales.²³⁴ No obstante, a fin de mejorar el valor añadido de los productos e ir más allá de la simple conservación, pueden liberarse otros compuestos, tales como odorantes o saborizantes, que mejoren las características organolépticas del producto.²³⁵ Por otra parte, la liberación controlada permite prolongar la adición del aditivo en el tiempo y ésta es constante, mientras que con la adición directa se obtiene una concentración inicial de compuesto relativamente elevada, pero como el consumo es rápido se pierde rápidamente la actividad.

Todas estas aplicaciones, independientemente del mecanismo de interacción del envase con el alimento y el entorno, es posible establecer una clasificación basada en la función que el envase ejerce. A grandes rasgos, se encuentran envases implicados en la adsorción y eliminación de sustancias (O₂, CO₂, humedad, luz, olores desagradables), liberación y emisión de compuestos (antimicrobianos, antioxidantes, saborizantes), control de temperatura, control microbiano y de calidad.

Finalmente, se puede establecer una clasificación en función del mecanismo empleado para la incorporación de las sustancias activas:^{236,237}

- Incorporación de sustancias activas en saquitos, tiras y etiquetas. Se trata de sistemas que se incorporan al envase, pero de manera independiente. Han de orientarse de tal manera que permitan la liberación en el espacio de cabeza del envase, pero evitando el contacto directo con el propio alimento. Con estos sistemas se produce una transferencia, generalmente, de gases y vapores que se liberan o se absorben.
- Incorporación directa de sustancias activas en las películas del envase. Son sistemas que no llevan sistemas adicionales en el envase, sino que se incorporan directamente al propio material del envase mediante diversas aproximaciones, tales como atrapamiento, inmovilización en capas internas de sistemas multicapas o funcionalización del material en el lado en contacto con el alimento.
- Recubrimiento de las películas del envase. Se incorpora al propio envase una matriz que actúa como vehículo de las sustancias activas, a modo de segundo recubrimiento, que está en contacto directo con el alimento.

A pesar de que actualmente la primera aproximación es la más extendida, los sistemas de incorporación directa están despertando un gran interés ya que simplifican el manejo y fabricación de los materiales de envasado y evitan un posible riesgo derivado del consumo accidental de los componentes bioactivos, como puede ocurrir en caso de rotura de un saco. Además, suponen un valor añadido de cara al consumidor ya que no percibe dicho aditivo como un elemento extraño en el producto, evitando su rechazo.²³⁸

5.3.1.2. Aspectos legales y de seguridad

Considerando la interacción que los materiales activos tienen con los alimentos y su entorno, antes de su empleo en el envasado de alimentos es necesario evaluar y garantizar su inocuidad para el consumidor. En el caso de los envases de liberación controlada, debe conocerse la compatibilidad e inocuidad de las sustancias liberadas y, de forma general para todos los envases, deben considerarse problemas asociados a la migración de otras sustancias provenientes del propio material de envasado al alimento.²²²

En lo que respecta a los envases en general, se aplica la normativa relacionada con los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, recogida en los reglamentos (UE) nº 10/2011 y nº 2016/1416.^{239,240} Dichos reglamentos definen tanto el tipo de envase, que puede estar en contacto con según qué tipo de alimento, como aquellos monómeros y sustancias que se pueden utilizar para la síntesis de los materiales de envasado. Como se ha comentado anteriormente, es necesario evaluar la migración de los componentes del envase hacia los alimentos. Estos reglamentos recogen varios tipos de medios-modelo a ensayar en función del tipo de alimento envasado y de las condiciones de uso. Así, debe tenerse en cuenta la legislación vigente para la selección de los monómeros empleados en la síntesis de los materiales de envasado. Por otra parte, debe evitarse la migración del resto de componentes utilizados en su síntesis, especialmente de aquellos que puedan ser perjudiciales para la salud del consumidor.

Como se indicó al comienzo de este capítulo, existe también una legislación específica para el uso y fabricación de los envases activos.^{225,226} En resumen, la regulación

establece que dichos envases no pueden transferir sustancias a los alimentos en cantidades que puedan suponer un daño para la salud humana, producir cambios inaceptables en los alimentos y deteriorar las características organolépticas de los mismos. Además, es necesaria una correcta identificación de las sustancias presentes en el envase de manera que, en todo momento, se conozca su composición y, en el caso que corresponda, las sustancias que van a ser liberadas por el mismo sin que haya ningún tipo de duda o malentendido.

Es posible resumir todas estas indicaciones relacionadas con la seguridad de los envases activos en tres aspectos principales:²²²

1. Correcto etiquetado de manera que se evite el uso indebido por parte de los intermediarios o consumidores.
2. Evaluación de la migración de los nuevos componentes de los envases, así como de derivados de los mismos, en función de su toxicidad y de acuerdo a la normativa establecida en la legislación vigente. Es necesario realizar pruebas de migración en sistemas modelo acordes con estos nuevos envases ya que las existentes no están adaptadas a los envases activos.
3. Eficiencia del envase para realizar la función deseada sin generar efectos adversos o colaterales derivados del uso del mismo.

5.3.2. Aplicación de los sistemas de liberación controlada como envases activos

Dados los múltiples beneficios que presentan actualmente los sistemas de liberación controlada hay numerosos ejemplos, descritos en la bibliografía, de envases activos que aprovechan dicha tecnología. Cabe recordar que la liberación controlada busca extender la vida útil de los alimentos, liberando compuestos que preserven los mismos de la degradación, o añadiendo sustancias con el tiempo que eviten la pérdida de las propiedades organolépticas del producto.

Se han descrito diversas aplicaciones que utilizan la microencapsulación para el desarrollo de este tipo de sistemas. Se basan en la encapsulación de un componente sólido, líquido o gaseoso en un material, que actúa de contenedor, de manera que pueda ir liberándose lentamente mediante difusión. Este método se ha utilizado para la liberación de aromatizantes²³⁵ o de aceites esenciales con actividad antimicrobiana.²⁴¹

Una de las alternativas más utilizadas para la fabricación de materiales activos, principalmente debido a la sencillez de su empleo y a que ya se aplican en el envasado, son los materiales poliméricos. Por ejemplo, existe un material que combina diversas capas de polímero, como polietileno de alta densidad, etilenvinilalcohol y polietileno de baja densidad que contiene α -tocoferol, empleado como antioxidante en sistemas de liberación controlada.²⁴² También se han fabricado películas de polipropileno de una sola capa para la liberación de timol y carvacol con el mismo fin.²⁴³

Los materiales moleculares mesoporosos supusieron un punto de inflexión en el mundo de la investigación y el campo de los envases activos no fue una excepción. Un ejemplo de su uso es la fabricación películas de polietileno de baja densidad modificadas con tamices moleculares mesoporosos cargados con α -tocoferol, para prevenir la oxidación lipídica de los alimentos.²⁴⁴

Con el objetivo de desarrollar envases activos respetuosos con el medio ambiente, se han desarrollado biopolímeros biodegradables y reciclables que permiten, además, la liberación controlada de diversos compuestos. Entre ellos destaca la celulosa microfibrilada que se ha empleado para cubrir papel de envasado, o para generar materiales compuestos con el mismo, que permiten la liberación controlada desde superficies micro o nanoestructuradas.²⁴⁵ Por ejemplo, en combinación con ciclodextrinas, este tipo de materiales se han empleado como antimicrobianos,^{246,247} o como barreras frente al oxígeno y la humedad utilizando borax²⁴⁸. Actualmente se está trabajando en el desarrollo de nanocelulosa, en diferentes formatos, para su empleo en envases activos con liberación controlada.²⁴⁹

El uso de nanopartículas metálicas también se ha extendido a la fabricación de materiales activos por ejemplo, se han desarrollado películas que contienen nanopartículas de selenio para prevenir la oxidación de los alimentos.^{250,251} No obstante, en este caso, debe evitarse su liberación al alimento, ya que si bien se conoce la actividad antimicrobiana y antioxidante de las nanopartículas magnéticas, se desconocen las consecuencias que su ingesta pueden tener sobre la salud humana a largo plazo.

Finalmente, una de las tecnologías más prometedoras en este campo es el uso de los MIPs como sistemas de liberación controlada. Estos materiales, como se describe en

el apartado 5.4., permiten la retención selectiva de elevadas concentraciones de la especie de interés, que puede liberarse de forma controlada mediante impulsos externos o por simple difusión.²⁵²

5.3.3. Antioxidantes en alimentos

Los antioxidantes son sustancias que, incluso a baja concentración, retrasan o minimizan la oxidación de lípidos y proteínas incrementando la calidad y estabilidad del alimento, y su tiempo de almacenamiento.²⁵³

Las principales alternativas para impedir la formación o la propagación de los radicales libres responsables de la autooxidación son: a) la captura de las especies iniciadoras de la peroxidación; b) complejación de metales que pueden generar especies reactivas o descomponer los lípidos; c) eliminación de los radicales $O_2^{\cdot -}$ que promueven la formación de peróxidos y d) bloqueo de la reacción en cadena de la autooxidación; e) reducción de la cantidad de oxígeno.²⁵⁴ A continuación se describe el mecanismo de la oxidación lipídica responsable de la formación de los radicales libres.

5.3.3.1. Oxidación lipídica

También denominada autooxidación, es uno de mayores problemas encontrados en el procesado, envasado y almacenamiento de alimentos con un elevado contenido graso. La reacción se produce entre el oxígeno molecular y compuestos orgánicos, en este caso ácidos grasos, presentes en el alimento que originan compuestos no deseados mediante un mecanismo de reacción en cadena mediado por radicales libres (Figura 15).²⁵⁵ A nivel nutricional, la reacción de autooxidación supone una disminución de la calidad y la inocuidad alimentaria, debido a la destrucción de nutrientes y a la generación de compuestos potencialmente tóxicos. En lo que respecta a los cambios organolépticos observados en los alimentos, puede producirse un deterioro en el aroma, derivado de la generación de nuevos compuestos volátiles; cambios de sabor, debido a la presencia de ácidos hidroxilados; cambios de color, por ejemplo el pardeamiento del alimento debido a la reacción de condensación entre los productos de oxidación y las proteínas o cambios de textura que se atribuyen al entrecruzamiento de las proteínas debido a la oxidación.²⁵⁶

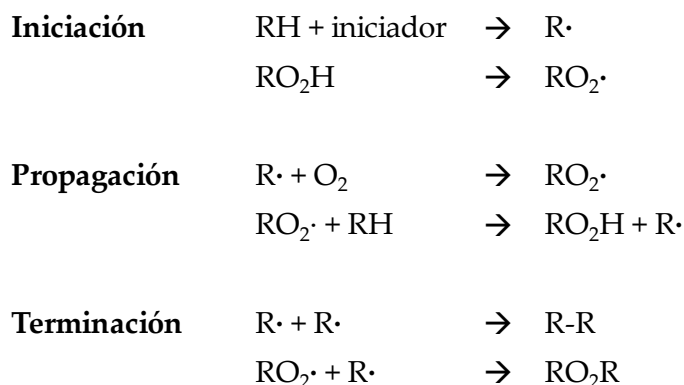


Figura 15. Esquema de las reacciones de autooxidación. En la iniciación, se forma el radical ($\text{R}\cdot$) a partir de una molécula lipídica insaturada (RH) o un lipohidroperóxido (RO_2H) mediante la reacción con un iniciador. Durante la propagación, los radicales libres reaccionan con el oxígeno para formar un hidropéroxido, RO_2H y otro radical. El proceso finaliza con la reacción entre productos que no están involucrados en la reacción de propagación.²⁵⁷

La autooxidación suele tener mayor impacto en el caso de los alimentos que tienen un elevado contenido en grasas, como la mantequilla, siendo de gran importancia en el deterioro de los mismos durante el almacenamiento. No obstante, los problemas de calidad derivados de la oxidación lipídica también son importantes en alimentos con bajo contenido en grasa, en los que los productos de descomposición se volatilizan y se perciben de una manera más inmediata.²⁵⁸

Es importante minimizar, o retrasar, este tipo de reacciones que afectan negativamente a la calidad y seguridad de los alimentos durante su almacenamiento. En este sentido la industria alimentaria trabaja en varias aproximaciones para prevenir este fenómeno, como por ejemplo el empaquetamiento en atmósfera inerte o a vacío.²⁵⁹ El principal problema de esta técnica es que, si bien evita los procesos de oxidación debido a la ausencia de oxígeno, favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios y puede producir cambios en la pigmentación de los alimentos, repercutiendo negativamente en la calidad e inocuidad del producto. Además, esta atmósfera se pierde cuando se abre y cierra el envase en sucesivas ocasiones. Por todo ello, en los últimos años se ha realizado un esfuerzo importante en la búsqueda y empleo de antioxidantes que eviten los inconvenientes descritos anteriormente.

5.3.3.2. Antioxidantes naturales

De manera general, los antioxidantes, naturales o artificiales, interfieren en el proceso de autooxidación inhibiendo la iniciación y la propagación de la cadena o suprimiendo la formación de radicales libres por acción quelante, desactivando el superóxido y reduciendo el peróxido de hidrógeno.²³⁶ De todos los antioxidantes existentes, los más efectivos son aquellos que actúan interrumpiendo la formación de radicales libres. Los compuestos fenólicos actúan a ese nivel, donando H a los radicales libres formados durante la oxidación y convirtiéndose ellos mismos en radicales. Estos intermedios se estabilizan gracias a la deslocalización electrónica por resonancia en el anillo aromático formando estructuras tipo quinona. Además, muchos compuestos fenólicos carecen de posiciones adecuadas para el ataque del oxígeno molecular lo que evita la propagación de la oxidación lipídica.²⁶⁰

El uso de antioxidantes en alimentos está regulado, tanto en Europa como en otros países del mundo.²⁶¹⁻²⁶³ A pesar de que existe un elevado número de compuestos con buenas propiedades antioxidantes, solo un número reducido pueden utilizarse en los alimentos.

La Comisión del *Codex Alimentarius* (o “Código Alimentario”) constituye el elemento central del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias y fue establecida por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) con la finalidad de proteger la salud de los consumidores y promover prácticas leales en el comercio alimentario. Esta organización solo permite el uso de los antioxidantes que hayan sido evaluados por el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO y la OMS (JECFA) y en alimentos estandarizados por el *Codex Alimentarius* (conjunto de normas, directrices y códigos de prácticas aprobados por la Comisión).²⁶⁴

Compuestos sintéticos como la terbutilhidroquinona (TBHQ, E-319), el hidroxibutilanisol (BHA, E-320) o el butilhidroxitolueno (BHT, E-321) (Figura 16) han demostrado tener estas propiedades y, de hecho, han sido utilizados como antioxidantes en alimentos, especialmente en aquellos grasos o con un contenido graso considerable. Sin embargo, existe una gran demanda por parte de los consumidores de antioxidantes provenientes de fuentes naturales. Por ejemplo, los antioxidantes naturales han

demostrado un gran rendimiento en la inhibición de la oxidación lipídica, en ocasiones incluso mejor que algunos productos sintéticos como el TBHQ.²⁶⁵ Otro factor a tener en cuenta es que la legislación es menos restrictiva con los antioxidantes naturales que con los de origen sintético, lo que abre un amplio abanico de posibilidades a la hora de seleccionar las dosis y las fuentes de obtención de estos antioxidantes. El gran problema de este tipo de compuestos es su baja abundancia en el medio ambiente y, por tanto, la dificultad de su producción a gran escala.²⁶⁶

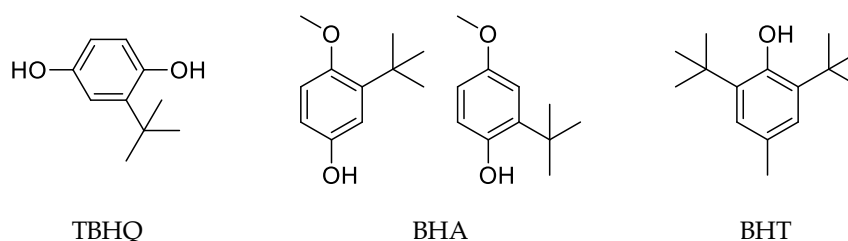


Figura 16. Estructura química de la terbutilhidroquinona (TBHQ, E-319), el hidroxibutilanisol (BHA, E-320) y el butilhidroxitolueno (BHT, E-321).

Es necesario mencionar que en los últimos años se ha trabajado mucho en la combinación de la tecnología de los envases activos y los antioxidantes naturales. En comparación con la inclusión directa en el alimento, los materiales activos actúan como fuente de antioxidantes de una manera controlada, manteniendo una concentración constante en el propio alimento. De esta manera se precisan cantidades menores de agentes activos, se logra una acción más localizada y se eliminan etapas de procesamiento sobre el propio alimento para la inclusión de los antioxidantes.²⁵³

Diversos trabajos demuestran como el uso de los extractos naturales, o incluso subproductos de producción de alimentos y bebidas, en envases activos con capacidad antioxidante, ha supuesto un gran avance en este campo. La gran ventaja de estos productos naturales es que, además de minimizar los procesos oxidativos, son moléculas seguras y que, en ocasiones, presentan beneficios para la salud. El uso de aceites esenciales de limón o naranja,²⁶⁷ residuos de la fabricación de cerveza²⁶⁸ o extractos de té,²⁶⁹ entre otros, han sido aplicados en el desarrollo de envases activos antioxidantes con excelentes resultados. En la Tabla 7 se muestra un resumen de las aplicaciones más recientes en cuanto al desarrollo de envases activos con fines antioxidantes.

Tabla 7. Ejemplos más representativos de envases activos aplicados a fines antioxidantes.

Sustancia activa	Fuente de obtención	Material del envase	Tipo de inmovilización	Alimento	Ref.
Ác. ascórbico Quercetina Ác. ferúlico GTE	Varios*	EVOH	Deposición	Sardinas	269
Polifenoles	PPVP-WS	LDPE	Atrapamiento	Ternera	268
Carvacrol Timol	Varios*	PP	Atrapamiento	Simulantes	243
Ác. ferúlico	PVPP-WS*	MIP	Reconocimiento selectivo	Mantequilla Pollo	252, 270
Ác. carnósico	Aceite de romero	LDPE	Deposición	Cerdo	271
Cinamaldehído	Canela*	LDPE	Incorporación a la red polimérica	Carne Queso	272
n.d.	Hojas de olivo	LDPE/ LDPE	Atrapamiento adhesivo	Cerdo	273
Tirosol Ác. ferúlico Ác. cafeico	Varios*	Quitosano Gelatina	Atrapamiento	n.d.	274
Polifenoles	Yerba mate Carotenoides*	LDPE	Atrapamiento	Mantequilla	275
β -caroteno	Zanahorias	Almidón de yuca	Atrapamiento Nanoencapsulado	Aceite de girasol	276
Timol	Tomillo* Orégano*	LDPE-PAE	Incorporación a la red polimérica	n.d.	277
α -tocoferol	n.d.*	LDPE MCM-41	Adsorción	n.d.	244

* Extracto comercial

n.d.: no descrito

EVOH: copolímero de etilen-vinil-alcohol; GTE: extracto de té verde; PVPP-WS: solución de lavado de polivinilpirrolidona (subproducto de la fabricación de la cerveza); LDPE: polietileno de baja densidad; PP: polipropileno; MIP: polímero de impronta molecular; PAE: poli(ésteres de anhídrido); MCM-41: sílice mesoporosa (*Mobil Composition of Matter* N^o. 41).

Como se aprecia en la Tabla 7, la mayoría de los antioxidantes naturales utilizados son polifenoles o derivados fenólicos. Los principales antioxidantes fenólicos naturales obtenidos a partir plantas se pueden clasificar en cuatro grupos generales (Figura 17):

- Ácidos fenólicos (*p.e.* ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico o ácido rosmarínico).
- Diterpenos fenólicos (*p.e.* carnosol o ácido carnósico).
- Flavonoides (*p.e.* quercetina o catequina).
- Aceites volátiles (*p.e.* eugenol, carvacrol, timol o mentol).

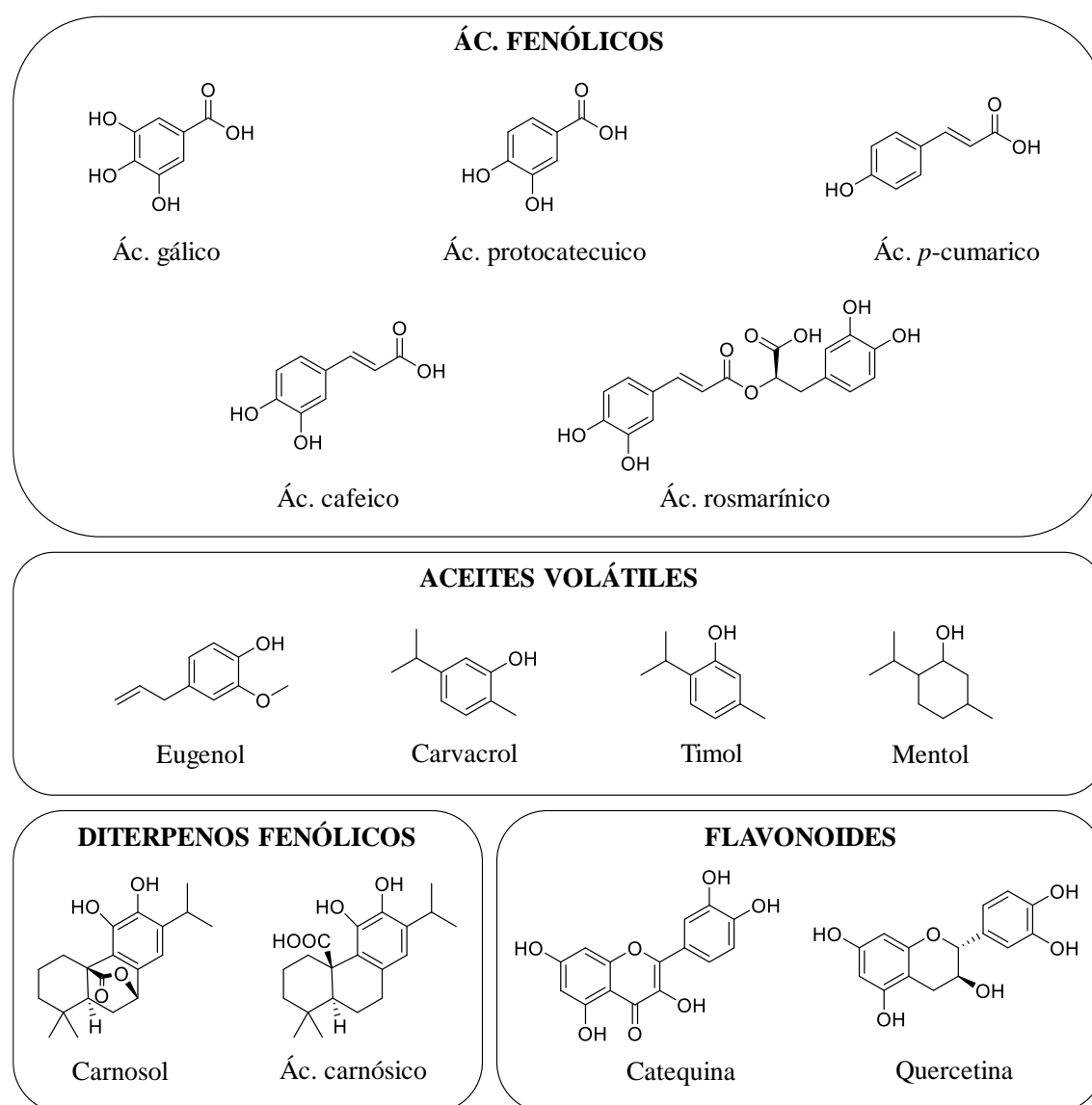


Figura 17. Estructura química de los antioxidantes naturales fenólicos más utilizados, obtenidos a partir de plantas.

En cuanto a los mecanismos de acción cabe destacar que los ácidos fenólicos generalmente atrapan los radicales libres, mientras que los flavonoides pueden eliminar los radicales libres y quelatar metales.²⁶⁰ Dentro de los ácidos fenólicos se encuentra el ácido ferúlico, un derivado del ácido cafeico con actividad antioxidante que puede ser encontrado en grandes cantidades en frutas y vegetales así como en bebidas tales como la cerveza o el café. Estas propiedades, unidas a su baja toxicidad, han hecho que sea comúnmente utilizado como conservante así como en la síntesis de geles o películas comestibles.^{252,270}

5.3.3.3. Ácido ferúlico

El ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico o ácido ferúlico (FA, Figura 18) se aisló por primera vez en 1866 y fue sintetizado y caracterizado en 1925. El doble enlace presente en la cadena lateral está sujeto a una isomerización cis-trans y el radical fenoxi, estabilizado por resonancia, explica su efectividad como antioxidante. Como ya se ha comentado anteriormente está presente en gran cantidad de productos vegetales formando parte de la pared celular. El FA se encuentra comúnmente en arroz, trigo, avena, piñas, hierbas, granos, verduras, flores, frutas, hojas, frijoles, semillas de café, alcachofa, cacahuètes y nueces.²⁷⁸

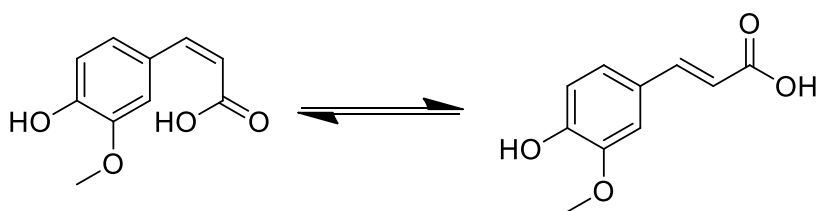


Figura 18. Estructura química del ácido ferúlico en sus dos formas isoméricas.

Uno de los grandes problemas para la aplicación como antioxidante del FA es su obtención, ya que, a pesar de ser prácticamente ubicuo, se encuentra formando parte de las paredes celulares y ello dificulta su extracción, que requiere una hidrólisis alcalina. Por lo general, el FA obtenido mediante procesos químicos no se considera de origen natural, por lo que se están buscando métodos enzimáticos alternativos que faciliten su liberación a partir de fuentes naturales.²⁷⁸

Una alternativa para la obtención de FA ha resultado ser la fabricación de la cerveza. Se ha comprobado que la adición de lúpulo, cereales y malta en el proceso de

producción, conduce a un mayor contenido de compuestos antioxidantes naturales en la cerveza, principalmente compuestos fenólicos, entre los que se encuentra el FA.²⁷⁹ Durante la maceración de la cerveza, a temperaturas de entre 40 y 50 °C, se produce la liberación al medio por acción de enzimas hidrolasas de FA, entre otros. En concreto, la enzima feruloil esterasa, procedente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en la fermentación de la cerveza, se encarga de romper las uniones del FA y los polisacáridos de la pared celular.^{280,281} Este tipo de compuestos polifenólicos son los encargados de otorgar determinados matices de sabor a la cerveza y ejercer un efecto antimicrobiano en la misma.²⁸² Sin embargo, la industria cervecera tiende a eliminar estos polifenoles ya que, con el tiempo, reaccionan con las proteínas presentes en la cerveza, formando complejos insolubles que dan un aspecto turbio a la misma. Para la eliminación de estos compuestos se utilizan estabilizantes como la polivinilpirrolidona (PVPP), una versión polimerizada e insoluble en agua/cerveza de la polivinilpirrolidona (PVP), un polímero que tiene una afinidad aún mayor por la unión química con los polifenoles que las proteínas presentes en la cerveza. Se produce una unión selectiva entre el polímero y los compuestos fenólicos por formación de enlaces de hidrógeno entre las amidas del PVPP y los grupos hidroxifenólicos, tal y como ocurriría con las proteínas. El PVPP se dispersa en la cerveza en forma de granulado fino y de gran superficie, logrando que una proporción muy elevada de los polifenoles y ácidos fenólicos se adhieran a las partículas poliméricas, que posteriormente se filtrarán.²⁸³ Tras el filtrado se obtiene una torta de PVPP que ha de lavarse para poder ser utilizada de nuevo. Es en estos licores de lavado (PVPP-WS, del inglés *PVPP washing solution*) en los que se pueden encontrar los diferentes polifenoles que han sido retirados de la cerveza, entre ellos el FA, y que pueden ser aprovechados posteriormente.²⁸⁴ La obtención de dichos antioxidantes como subproductos de la fabricación de la cerveza fue la razón que motivó al desarrollo de materiales de liberación controlada selectivos a FA, que ha sido uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral. De esta manera se logra desarrollar una química sostenible basada en el aprovechamiento de los subproductos generados en diversos procesos industriales, en este caso en la fabricación de la cerveza.^{285,286}

Si se compara con otros derivados fenólicos, el FA tiene dos ventajas: su elevada actividad antioxidante y su estabilidad frente a cambios de pH. En el primer caso, comparado con otros ácidos relacionados como puede ser el ácido cafeico, se comprobó que tenía una mayor efectividad inhibiendo la oxidación de lípidos y proteínas gracias a la presencia de sustituyentes en el anillo aromático. Además, se ha demostrado el efecto sinérgico del FA reforzando la actividad antioxidante de la lactoferrina en sistemas lipídicos que contenían hierro.²⁸¹

En conclusión, los beneficios asociados al empleo del FA indicados anteriormente, junto a su poder antimicrobiano,²⁸⁷ en el cual no se ha profundizado pero que tiene a su vez una gran importancia, hacen de este compuesto una buena alternativa a los derivados fenólicos sintéticos para su uso como antioxidante, especialmente en combinación con las tecnologías de envases activos y de liberación controlada descritos en este apartado.

5.4. Polímeros de impronta molecular

El reconocimiento molecular juega un papel fundamental en numerosos procesos analíticos. El uso de biomoléculas como los anticuerpos, las enzimas, los ácidos nucleicos o los tejidos, entre otros, con fines analíticos está limitado, en muchas ocasiones, por la escasa estabilidad de las biomoléculas en condiciones adversas, su reducida disponibilidad o sus elevados costes de producción. Como resultado, la investigación en el campo de los receptores artificiales se ha expandido considerablemente en las últimas décadas. Los investigadores han tratado de “imitar” a la naturaleza inspirándose en ella para implementar las funcionalidades de los elementos de reconocimiento de origen biológico en materiales artificiales que sean más robustos, estables, versátiles o económicos que sus homólogos naturales.

Dentro de este grupo de elementos de reconocimiento biomimético se incluyen los polímeros de impronta molecular (MIPs, del inglés *molecularly imprinted polymers*). Se trata de materiales sintéticos que reconocen selectivamente a un determinado analito o a una familia de compuestos. Para ello se forma una estructura macromolecular muy entrecruzada alrededor de una molécula “plantilla” que se extrae tras la polimerización. Se originan así cavidades (sitios de unión), complementarias en forma, tamaño y distribución de grupos funcionales a la molécula plantilla, lo que permite su reconocimiento selectivo de forma similar al reconocimiento que se da en las enzimas o los anticuerpos.²⁸⁸ Los MIPs se han utilizado con éxito como elementos de reconocimiento en extracción en fase sólida, cromatografía, catálisis y (micro)sensores. El área de aplicación comercial más avanzada es la extracción en fase sólida (“MISPE”).

5.4.1. Inicio y evolución de la impronta molecular

Uno de los objetivos de la ciencia ha sido comprender y emular los mecanismos de la naturaleza, como por ejemplo el reconocimiento molecular.

En el año 1899 Ehrlich postuló la existencia de unas “cadenas laterales específicas” en las células a las que denominó receptores, caracterizadas por una estructura química singular, que sólo podían combinarse con anticuerpos que poseyeran una composición química y una forma adecuada. La interacción estereoespecífica entre fármaco y receptor

la definió gráficamente como un sistema “llave-cerradura”.²⁸⁹ Posteriormente los estudios de Linus Pauling reforzaron las teorías sobre el reconocimiento complementario de ciertos sustratos por parte de las enzimas,²⁹⁰ iniciándose los trabajos en el campo del bioreconocimiento. Pauling y Campbell observaron que la re-naturalización de ciertas γ -inmunoglobulinas, en presencia de un antígeno, provocaba un incremento en el reconocimiento del mismo, por lo que se consideran pioneros en el campo de la bioimpronta.²⁹¹

No obstante, el primer descubrimiento en relación a la impronta molecular data de 1931, cuando M.V. Polyakov observó que los geles de sílice que había sintetizado presentaban gran afinidad por el disolvente de síntesis.²⁹² No fue hasta los años 50 cuando se comenzó a trabajar en este campo de una manera mucho más intensa y en mayor profundidad. Los siguientes logros se deben a los experimentos de Dickey, discípulo de Pauling, quién llevó a cabo la síntesis de gel de sílice en presencia de un colorante. Comprobó que, una vez extraído el colorante, la matriz era capaz de retener preferentemente éste frente a otros, creando materiales con afinidad frente a ciertas moléculas, tal y como había descrito su mentor años antes.²⁹³ Aunque estos geles son considerados como los primeros materiales de impronta molecular, durante los siguientes años no se consiguieron grandes avances en este campo y, de hecho, prácticamente cesaron las investigaciones en este tipo de materiales basados en sílice.

Sin embargo, en los años 70 se produjo un hecho que significó un punto de inflexión y el verdadero despunte del campo de la impronta molecular. Gunter Wulff sintetizó el primer polímero de impronta covalente utilizando monómeros vinílicos, lo que abrió camino a los polímeros orgánicos en este campo.²⁹⁴ Posteriormente, durante los años 80, Klauss Mosbach desarrolló el concepto de impronta no covalente, siendo el de mayor aplicación en la actualidad.²⁹⁵ Más tarde, a mediados de la década de los 90, Michael Whitcombe desarrolló el concepto de impronta semicovalente,²⁹⁶ como una combinación de las dos técnicas citadas anteriormente. Cabe destacar que, mediante cualquiera de las aproximaciones citadas, se logró la síntesis de redes poliméricas basadas en monómeros orgánicos que presentaban cavidades específicas para el analito de interés. Además, estos polímeros se caracterizaban por ser “altamente entrecruzados”, una característica de los MIP para mantener la conformación tridimensional de la cavidad de reconocimiento

selectivo una vez extraída la plantilla. Para lograr esta rigidez, se incluyó un elevado porcentaje de monómeros entrecruzantes en la mezcla de prepolimerización, algo que se ha mantenido en la síntesis de MIPs hasta la actualidad. Sin embargo, han aparecido nuevas técnicas y formatos que no presentan dicha restricción estructural en la red polimérica, como es el caso de los micro y nanogeles, lo que además acelera las cinéticas de unión.²⁹⁷

La evolución en el campo de los MIPs se ha incrementado de forma exponencial en los últimos años en cuanto a formatos, técnicas de síntesis, aplicaciones y propiedades, adaptándose a las necesidades de cada momento y a los nuevos retos que se plantean. De hecho, a pesar de que se trata de un concepto relativamente nuevo, se pueden encontrar alrededor de 9500 entradas en los buscadores de la *Web of Science*, sin contar libros ni revisiones bibliográficas, de las cuales el 85% son artículos científicos (Figura 2).

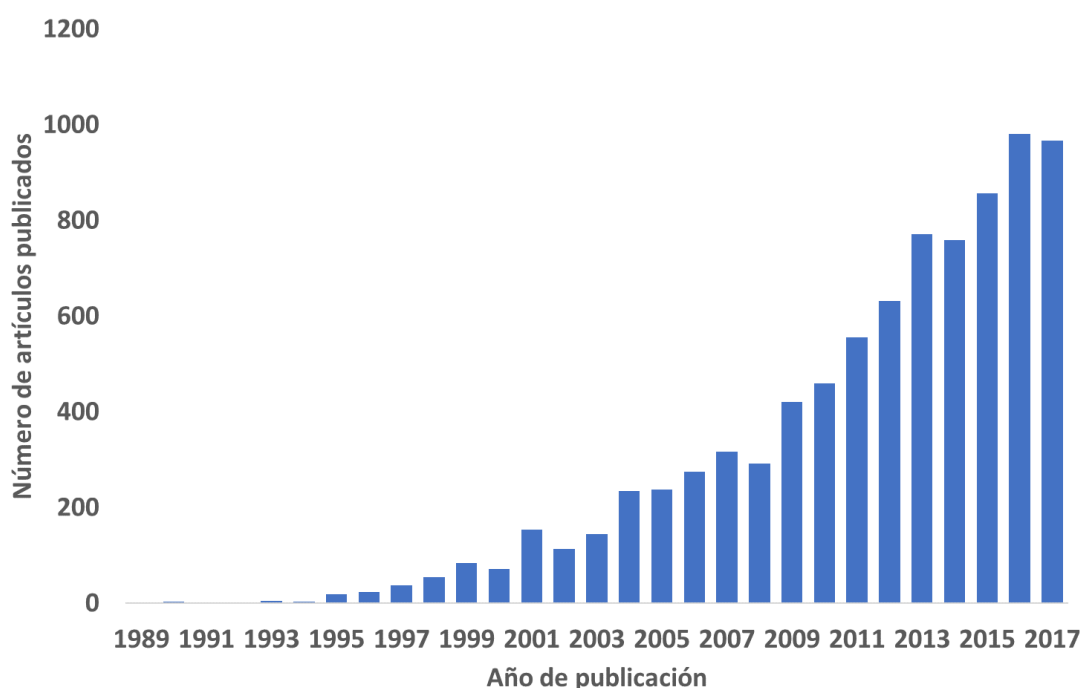


Figura 19. Progresión del número de publicaciones que emplean elementos de reconocimiento molecular basados en la tecnología de impronta molecular en el periodo 1989-2017. Base de datos de *Web of Science*.

5.4.2. Conceptos básicos de la impronta molecular

Según la RAE, se define impronta como la “reproducción de imágenes en hueco o de relieve, en cualquier materia blanda o dúctil, como papel humedecido, cera, lacre,

escayola, etc.” Si bien es un término que solo se recoge como adjetivo en el diccionario de la RAE, y no como verbo, el uso de sus formas verbales, tales como “improntado”, se realiza de forma habitual cuando se habla sobre este tipo de materiales, por lo que se han empleado a largo de la presente Tesis Doctoral.

Como se ha comentado anteriormente, los MIPs son materiales sintéticos que imitan el reconocimiento selectivo característico de moléculas de origen biológico, tales como los anticuerpos. A grandes rasgos, un MIP es un material sintetizado a partir de unidades monoméricas, llamadas monómeros funcionales, que, por un lado, presentan grupos funcionales susceptibles de polimerizar y, por otro, grupos que pueden interactuar con la molécula plantilla. Una mezcla de prepolimerización básica suele contener uno o varios monómeros funcionales, uno o varios monómeros entrecruzantes, una molécula plantilla, un iniciador de la polimerización y un disolvente, o porógeno. Sin embargo, es posible modificar la composición de esta mezcla para sintetizar polímeros con distintos formatos físicos o con diferentes características de reconocimiento.

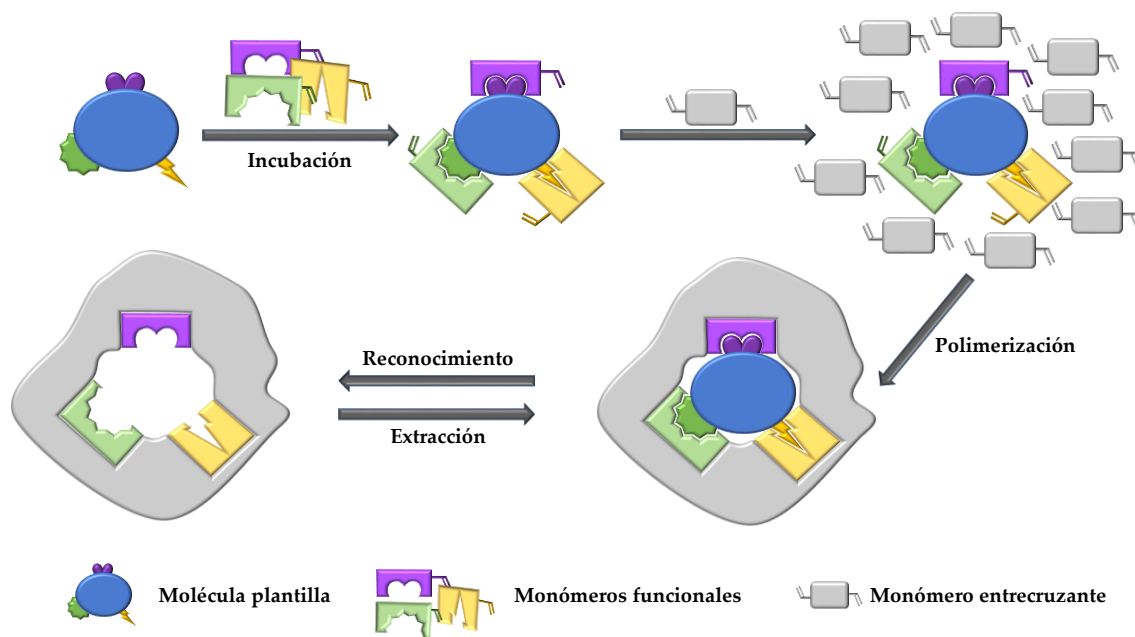


Figura 20. Representación esquemática de la síntesis de un MIP.

En la Figura 20 se representa esquemáticamente la síntesis de un MIP.²⁹⁸ En primer lugar, la plantilla se pone en contacto con el/los monómero/s funcional/es, de manera que se forma un complejo molécula plantilla-monómero/s mediante interacciones reversibles de tipo covalente o no covalente, incluyendo estas últimas las interacciones electrostáticas,

fuerzas hidrofóbicas o de van der Waals y enlaces de coordinación con metales. A continuación, se produce la polimerización en presencia de un monómero entrecruzante, y de un iniciador de radicales, aplicando calor o radiación UV, lo que permite obtener una matriz insoluble en la que se encuentra atrapada la molécula plantilla. Finalmente, tras una etapa de extracción se obtiene un material que presenta cavidades tridimensionales complementarias a la molécula plantilla en tamaño, forma y orientación de los grupos funcionales.

Si bien se espera, en un modelo ideal, que todas las cavidades específicas del polímero presenten la misma afinidad por la molécula plantilla, los diferentes complejos molécula plantilla-monómero funcional que se formen durante la etapa de pre- y polimerización o la diferente distribución de los monómeros pueden dar lugar una distribución heterogénea de sitios de unión por el analito que debe caracterizarse.²⁹⁹ Además, la diferente distribución de los monómeros funcionales a lo largo de la red polimérica puede traducirse en la presencia de algunos grupos funcionales en la superficie del material, lo que puede incrementar las interacciones no específicas.

Existen dos aproximaciones para evaluar la contribución de las uniones no específicas. La primera, y más utilizada, es la síntesis de un polímero que tiene la misma composición y que se prepara en las mismas condiciones que el MIP, pero en ausencia de molécula plantilla, denominado polímero no improntado o NIP (del inglés *non-imprinted polymer*). Cuando no es posible sintetizar el NIP, bien porque la ausencia de plantilla induzca a una diferente reactividad, de forma que la estructura del NIP sea totalmente diferente a la del MIP,²⁸⁸ o porque su presencia sea necesaria para actuar como núcleo para la polimerización,³⁰⁰ se sintetiza un polímero control (CIP, del inglés *control imprinted polymer*). El CIP se prepara utilizando una molécula plantilla diferente a la del MIP, por lo que presentará características similares a éste, en cuanto a estructura y composición, pero su afinidad por el analito será diferente.

En la Tabla 8 se presentan, a modo de resumen, las características más relevantes de los MIPs y sus ventajas y desventajas frente a los anticuerpos:

Tabla 8. Características generales de los MIPs en comparación con los anticuerpos.^{301,302}

	MIPs	Anticuerpos
Sitios de unión	Elevada heterogeneidad	Posibilidad de alta selectividad utilizando anticuerpos monoclonales
Preparación	Síntesis simple y fácil	Difícil síntesis y manejo
Afinidad	Moderada $10^3 - 10^9 \text{ M}^{-1}$	Elevada $10^9 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$
Coste	Económico	Elevado
Estabilidad	Robusto, resistente a medios y condiciones extremas	Inestable en condiciones extremas, precisan medios controlados
Selectividad	Media-alta	Alta
Disolvente	Medios orgánicos y acuosos	Medios acuosos controlados
Cinética	Moderada	Rápida
Reusabilidad	Posibilidad de ser reutilizados sin pérdida de la capacidad de unión	Muy limitada
Versatilidad	Cualquier molécula, salvo algunas excepciones	Dependencia de la generación de anticuerpos para un analito
Riesgos	Reactivos tóxicos	Nulos

5.4.3. Tipos de impronta molecular

En la bibliografía se describen diferentes aproximaciones para la síntesis de MIPs. Éstas se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios como el formato físico en el que se preparan o el tipo de interacción entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales para generar los sitios de unión. En principio, la principal división se establece entre impronta covalente y no covalente, aunque también es posible encontrar trabajos basados en impronta semicovalente y mediada por iones metálicos. A continuación, se describen los distintos tipos de impronta molecular en función de las interacciones que se producen entre la plantilla y los monómeros funcionales en la mezcla de prepolimerización.

5.4.3.1. Impronta covalente

El modelo de impronta covalente fue el primero en aplicarse para la síntesis de MIPs.³⁰³ Esta aproximación también se conoce como modelo pre-organizado y se basa en la formación de enlaces covalentes reversibles entre los monómeros funcionales y la molécula plantilla, mediante la síntesis previa de dicho complejo.³⁰⁴ Una vez obtenido el mismo se lleva a cabo la polimerización para formar la red polimérica y se extrae la plantilla rompiendo dichos enlaces covalentes. Cabe mencionar que durante la etapa de reconocimiento deben formarse de nuevo los enlaces previamente rotos. En la Figura 21 se muestra, a modo de ejemplo, un esquema del proceso de impronta covalente.

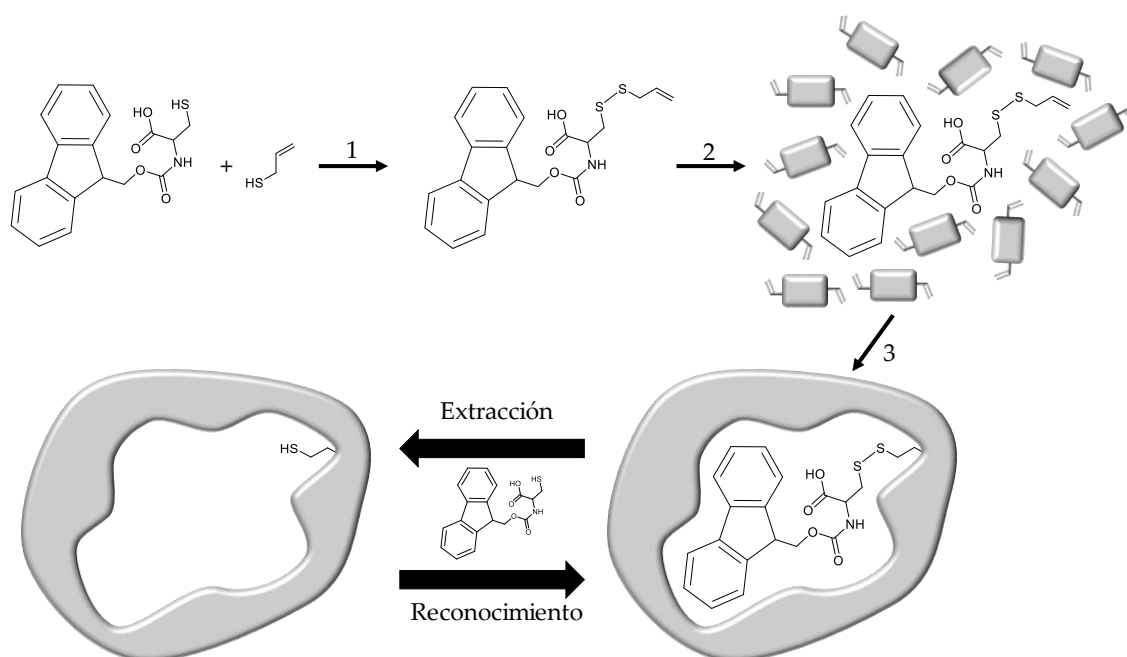


Figura 21. Esquema de la síntesis de un MIP para Fmoc-Cys(SH)-OH empleando el modelo de impronta covalente. 1) Generación del complejo covalente entre la molécula plantilla y el monómero funcional mediante, un enlace disulfuro. 2) Adición de la mezcla de prepolimerización. 3) Polimerización. La extracción de la molécula plantilla requiere la ruptura de los enlaces covalentes del complejo, que deberán volver a formarse en la etapa de reconocimiento. Adaptado de la referencia 305.

El hecho de generar el complejo de manera covalente supone un mayor control de la estequiometría del complejo de prepolimerización. Además, de esta manera, los monómeros se encuentran única y exclusivamente en los sitios de unión y no distribuidos al azar en el material polimérico. Esto, unido a la gran homogeneidad de los sitios de unión debido a la estabilidad del complejo plantilla-monómero, reduce en gran manera la unión no específica del polímero.

Sin embargo, este tipo de impronta está limitada a un reducido número de compuestos y de grupos funcionales, tanto en lo referente a monómeros como a plantillas, lo que limita su uso.²⁹⁸ Además, el hecho de tener que romper y formar enlaces covalentes hace que sea difícil la extracción de la molécula plantilla, y que el reconocimiento del analito por parte del polímero tenga una cinética lenta.

Actualmente, la impronta covalente es considerada la mejor ruta para la síntesis de MIPs con actividad catalítica ya que los grupos funcionales que producen dicho proceso se encuentran localizados en el interior de la cavidad.^{306,307}

5.4.3.2. Impronta no covalente

En la impronta no covalente, también conocida como modelo de autoensamblaje,³⁰⁴ las interacciones entre los monómeros funcionales y la molécula plantilla durante la polimerización son las mismas que se producen, posteriormente, en el proceso de reconocimiento. Estas interacciones se basan en fuerzas de tipo no covalente como los enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas o fuerzas dipolo-dipolo. Debido a la naturaleza relativamente débil de estas fuerzas, los complejos que se forman son inestables y pueden alterarse durante el proceso de polimerización, debido a la presencia de otros monómeros en la mezcla. Además, su cinética de formación afecta en gran manera en el proceso de impronta.³⁰⁸

Se trata de la aproximación más utilizada debido a la sencillez del proceso de impronta, pues no requiere la síntesis de un complejo con unión covalente previo a la polimerización; a que la extracción de la plantilla es mucho más fácil y a que las cinéticas de unión son más rápidas, debido a las débiles interacciones formadas. Sin embargo, aunque el proceso de lavado sea sencillo, puede darse el caso de que la molécula plantilla quede atrapada en los sitios de unión y se libere posteriormente durante el uso del material, lo que se conoce como sangrado.³⁰⁹ Para solucionar este problema, se pueden utilizar plantillas estructuralmente relacionadas con el analito objetivo para sintetizar el MIP en lugar de dicho analito. Además, el uso de estas moléculas supone una alternativa para evitar la toxicidad, coste y/o disponibilidad limitada del propio analito. En la Figura 22 se muestra, a modo de ejemplo, el esquema general del proceso de impronta no covalente.

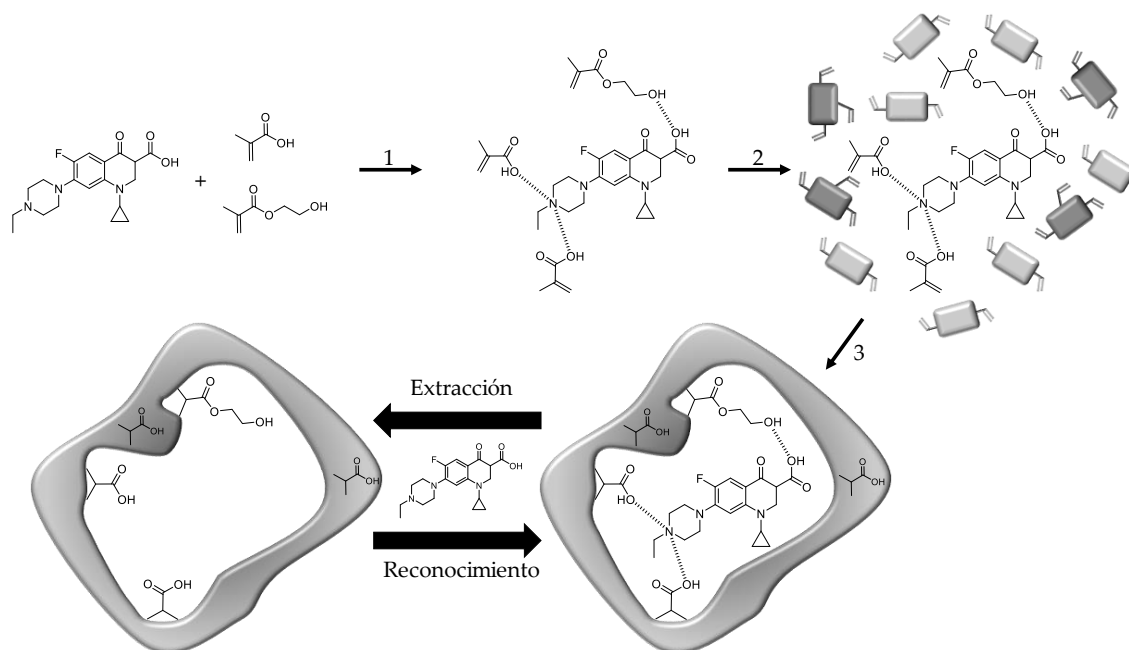


Figura 22. Esquema de la síntesis de un MIP para enrofloxacino empleando el modelo de impronta no covalente. 1) Generación del complejo entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales, mediante enlaces de hidrógeno. 2) Adición de la mezcla de prepolimerización. 3) Polimerización. Tras la extracción de la molécula plantilla, el reconocimiento tendrá lugar mediante enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Adaptado de la referencia 310.

Otra de las grandes ventajas de esta aproximación es la gran variedad de monómeros que se pueden utilizar durante la síntesis. En ocasiones incluso es posible utilizar mezclas de monómeros para lograr una mejor selectividad.³¹¹ De hecho, la creciente necesidad de desarrollar materiales más selectivos y con propiedades adicionales ha favorecido la síntesis de monómeros “a la carta”, entre los que destacan los fluorescentes por sus implicaciones en la fabricación de sensores.³¹²

Dado que la generación del sitio de unión depende de la formación del complejo molécula plantilla-monómero funcional, habitualmente se favorece la formación del mismo trabajando en exceso de monómeros funcionales.³¹³ Este hecho es el causante de una de las principales limitaciones de esta aproximación: la presencia de un elevado número de monómeros funcionales fuera de las cavidades de reconocimiento, lo que aumenta la probabilidad de uniones no específicas. Al mismo tiempo, el exceso de monómeros puede dar lugar a la formación de complejos de distinta estequiometría favoreciendo la aparición de cavidades selectivas con diferentes constantes de unión.²⁹⁹

5.4.3.3. Impronta semicovalente

La impronta semicovalente se basa en la unión covalente de la molécula plantilla y los monómeros funcionales antes del proceso de polimerización. Una vez obtenido el material y retirada la molécula plantilla, el reconocimiento se produce mediante interacciones no covalentes. Esta aproximación combina las ventajas de las dos aproximaciones mencionadas anteriormente, ya que se logra una mayor homogeneidad de sitios de unión y la cinética de reconocimiento está limitada únicamente por la difusión del analito hacia las cavidades. En la Figura 23 se muestra, a modo de ejemplo, un esquema del proceso de impronta no covalente.

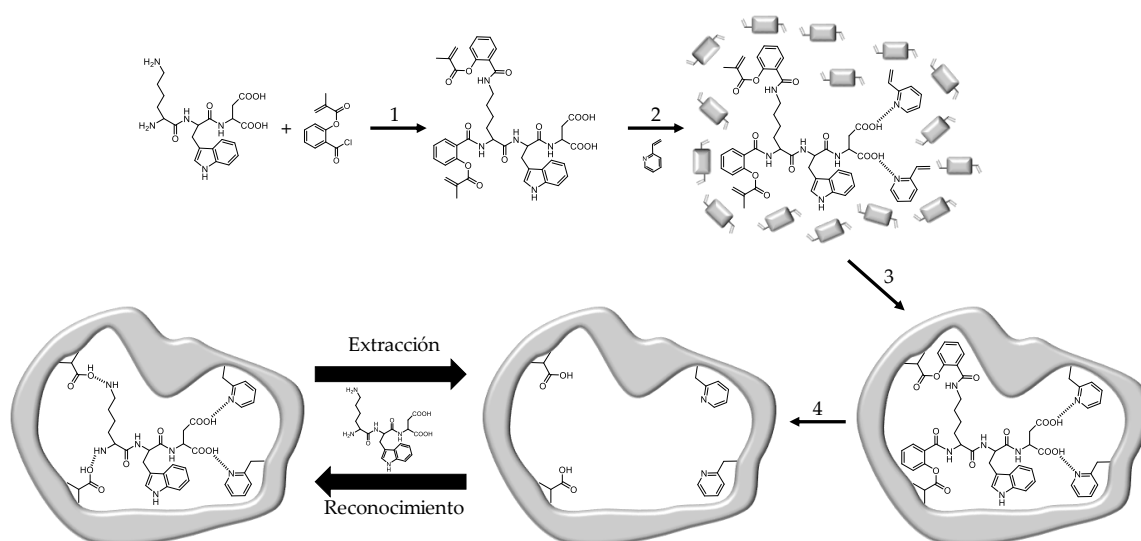


Figura 23. Esquema de la síntesis de un MIP para el triptéptido Lys-Trp-Asp empleando el modelo de impronta semicovalente. 1) Generación del complejo entre la molécula plantilla y el monómero funcional, mediante enlaces covalentes. 2) Adición de la mezcla de prepolimerización que contiene un otro monómero funcional que se une al complejo, mediante enlaces de hidrógeno. 3) Polimerización. 4) Extracción de la molécula plantilla mediante la ruptura de los enlaces covalentes. Tras la extracción de la molécula plantilla, el reconocimiento tendrá lugar mediante enlaces de hidrógeno. Adaptado de la referencia 314.

En este tipo de impronta molecular se pueden distinguir dos aproximaciones diferentes. Por un lado, es posible unir directamente la plantilla a los monómeros, funcionales exactamente igual que en la impronta covalente.³¹⁵ Por otro lado el enlace puede hacerse utilizando espaciadores, evitando así que los sitios de unión tengan un tamaño restringido, lo que facilita la difusión del analito hacia los mismos.³¹⁴

A pesar de tratarse de un proceso aparentemente sencillo presenta ciertos inconvenientes. Por un lado, la ruptura de los enlaces covalentes puede requerir condiciones de hidrólisis agresivas y, en ocasiones, poco eficaces, haciendo necesario el uso

de compuestos reductores como el LiAlH_4 . Por otro lado, las condiciones estéricas para la interacción de dos grupos funcionales pueden ser diferentes a las que se dan cuando dichos grupos están enlazados, por lo que a la hora del reconocimiento se pueden dar diversos problemas relacionados con la geometría de la cavidad y los impedimentos estéricos.³⁰⁸

5.4.3.4. Impronta mediada por metales

Otra aproximación, que podría incluirse dentro de la impronta no covalente, es la impronta mediada por metales. Esta aproximación se basa en la habilidad de los iones metálicos para interaccionar con gran variedad de grupos funcionales formando complejos de coordinación. La fuerza de estas interacciones es variable aunque, dependiendo tanto del metal como del ligando, en algunos casos puede llegar a ser comparable a la de los enlaces covalentes. En general, en este tipo de polímeros el reconocimiento tiene lugar mediante la formación de un complejo entre un metal, generalmente de transición, los ligandos polimerizables y el analito.

Esta aproximación se ha utilizado para la identificación de diversos compuestos, aunque no es de las más empleadas debido a la necesidad de regenerar el ion metálico para que se dé el reconocimiento.³¹⁶ Una de las innovaciones en este campo ha sido la síntesis de materiales foto-emisores empleando mediadores metálicos, en especial del grupo de las tierras raras.³¹⁷ Es interesante destacar los complejos formados por lantánidos con β -dicetonas los cuales presentan una gran eficiencia de emisión, largos tiempos de vida de emisión y grandes desplazamientos de Stokes debido al elevado coeficiente de absorción de las β -dicetonas.³¹⁸ En la Figura 24 se muestra un esquema del proceso de impronta no covalente mediada por metales.

5.4.4. Componentes de la mezcla de prepolimerización

La composición del material afecta de forma significativa a la selectividad y capacidad del MIP, independientemente del formato y la aproximación seguida para su síntesis. Los componentes principales del polímero se describen a continuación:

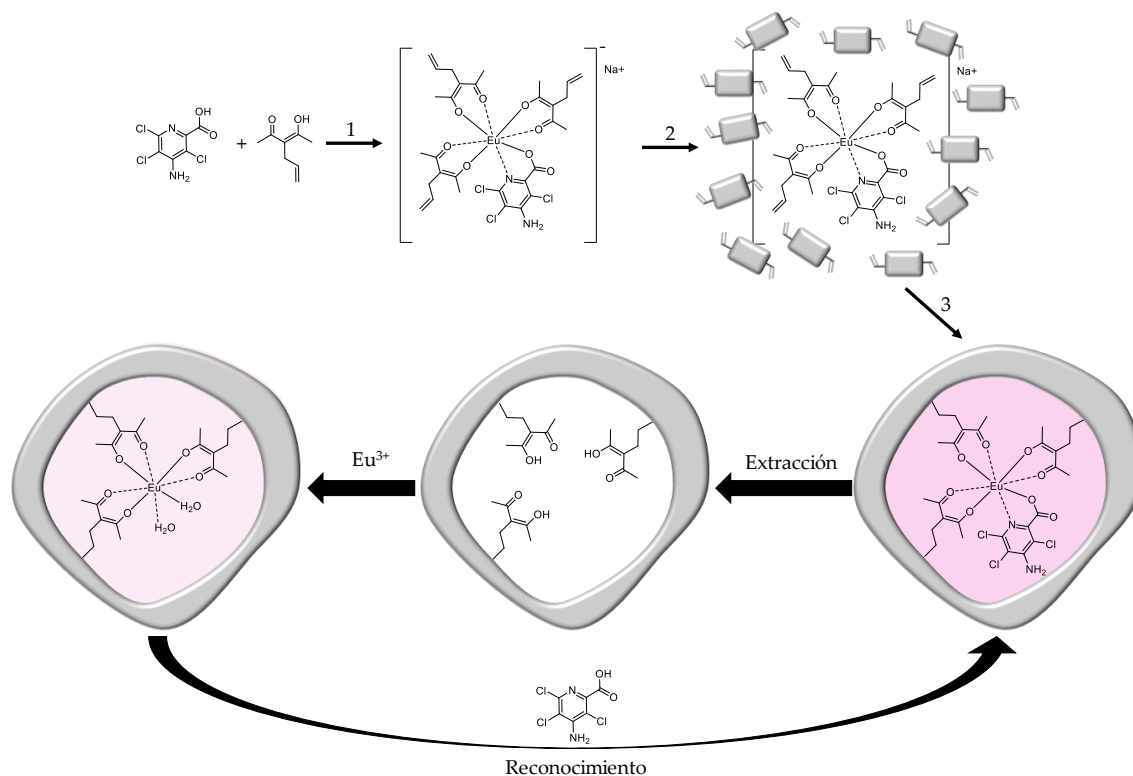


Figura 24. Esquema de síntesis de un MIP para Picloram empleando el modelo de impronta mediada por metales. 1) Generación del complejo de coordinación entre el Eu^{3+} , la molécula plantilla y los monómeros funcionales, que actúan como ligandos. 2) Adición de la mezcla de prepolimerización que contiene otro monómero funcional que se une al complejo mediante enlaces de hidrógeno. 3) Polimerización. Tras eliminar la molécula plantilla es necesario regenerar el metal para que se produzca el reconocimiento selectivo. Cuando se completa la coordinación al metal se produce la emisión de fosforescencia. Adaptado de la referencia 319.

A. Molécula plantilla. Tiene un papel fundamental en el proceso de impronta ya que es la responsable de las interacciones con los monómeros funcionales y, por tanto, de la generación de las cavidades de unión. En principio es posible imprimir cualquier tipo de molécula, siempre y cuando sea fotoestable o termoestable, en función de las condiciones de polimerización que se utilicen; soluble en la mezcla de prepolimerización, salvo que sea inmovilizado en una superficie sólida;³²⁰ y no debe contener grupos polimerizables que puedan reaccionar con el resto de la mezcla formando parte del polímero. Para la síntesis de MIPs suelen requerirse cantidades relativamente elevadas de molécula plantilla, lo que puede suponer un inconveniente cuando se trata de moléculas de precio elevado, muy tóxicas o de baja disponibilidad. Este problema puede evitarse mediante el uso de plantillas análogas al compuesto objetivo, que permitan generar sitios de unión similares a los que se obtendrían utilizando el analito de interés como plantilla.

- B. Monómeros funcionales. Son los encargados de aportar los grupos funcionales responsables de las interacciones con la molécula plantilla en la cavidad específica. Es necesario destacar que, cuanto más fuertes sean las interacciones entre los monómeros funcionales y la molécula plantilla, mayor será la selectividad y capacidad de unión de dichos polímeros. La elección de los monómeros funcionales depende de la estructura de la plantilla, por ejemplo, se emplean monómeros funcionales básicos para plantillas con grupos ácidos, y viceversa.
- C. Monómero entrecruzante. Su función es estabilizar las cavidades específicas y mantener los grupos funcionales en la posición adecuada para que se produzca el reconocimiento. El tipo y la cantidad que se utilice en la síntesis afectará, en gran manera, a la morfología y la estabilidad mecánica de la red polimérica. Mientras que el uso de un elevado porcentaje de entrecruzante da lugar a estructuras robustas y con una elevada área superficial, el empleo de porcentajes bajos genera geles que tienen ciertas limitaciones en el campo de la impronta a nivel de reconocimiento. Además, para lograr una buena copolimerización y una composición homogénea a lo largo del polímero, la reactividad de los monómeros funcionales y entrecruzantes debe ser similar.³²¹ La polaridad de este tipo de monómeros también es un factor a tener en cuenta en el reconocimiento. Por un lado, el uso de entrecruzantes polares puede favorecer la hidrofilia del material, favoreciendo el reconocimiento en disolventes de la misma naturaleza.³²² Por otro lado, juega un importante papel en la generación de los sitios específicos, ya que entrecruzantes con una polaridad tal que no esté favorecida su interacción con la molécula plantilla facilitan la interacción entre ésta y los monómeros funcionales, lo que se traduce en un mejor reconocimiento y menor unión no específica.³²³
- D. Monómeros diluyentes. Estos monómeros no interactúan con la molécula plantilla, pero presentan grupos funcionales, generalmente hidrofílicos, que mejoran la capacidad de reconocimiento selectivo del polímero en medios afines. De igual manera, deben ser compatibles con los monómeros funcionales y entrecruzantes de la mezcla de prepolimerización.
- E. Disolvente. También conocido como porógeno, debido a que es el responsable de la porosidad del material, juega un papel importante en el proceso de impronta, pues

debe facilitar la formación de un material macroporoso que permita la difusión del analito a los sitios de unión. Es el encargado de mantener todos los componentes de la mezcla en una misma fase y afecta de gran manera a la textura y forma final del material. En la impronta no covalente, el disolvente tiene un importante papel en la estabilización de los complejos molécula plantilla-monómeros funcionales, debido a la polaridad, la constante dieléctrica y la capacidad de protonar y desprotonar los grupos funcionales de ambas moléculas. Es muy importante elegir correctamente el disolvente de manera que facilite la interacción monomero-plantilla pero que no interfiera en el reconocimiento. Otro aspecto importante es el llamado “efecto memoria” según el cual, el MIP reconocerá en mayor medida al analito en el medio en el que ha sido sintetizado.³²⁴ Comúnmente, se ha trabajado con disolventes orgánicos pero la necesidad de imprimir moléculas que no son compatibles con estos medios, como por ejemplo las biomoléculas, ha hecho necesario el desarrollo de la impronta en medios acuosos más compatibles con este tipo de compuestos.

- F. Iniciador. La polimerización por radicales libres es una reacción en cadena, la cual consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La iniciación de polimerizaciones radicalarias puede llevarse a término mediante distintos procedimientos, aunque en todos los casos la producción de radicales libres suele ser la etapa determinante de la iniciación. La iniciación, por lo general, transcurre en dos etapas. La primera es la formación de algún radical libre y la segunda es la adición del radical libre a un monómero o prepolímero para formar una cadena radical. Seguidamente continuará la propagación y el crecimiento de las cadenas mediante reacciones radicalarias. Los radicales pueden producirse empleando métodos térmicos, químicos (redox) o fotoquímicos. El empleo de bajas temperaturas favorece la estabilidad del complejo entre la plantilla y los monómeros funcionales, por lo que para la síntesis de MIPs suele preferirse el empleo de luz UV y bajas temperaturas de polimerización, siempre que la molécula sea estable en esas condiciones. Es importante elegir a su vez un iniciador que no interaccione con los monómeros ni intervenga en el proceso de polimerización.

5.4.5. Formatos físicos de los polímeros de impronta molecular

Los MIPs se han sintetizado en distintos formatos en función de la aplicación final. En este capítulo se describen las características más relevantes de los mismos.

5.4.5.1. Polimerización en bloque

La polimerización en bloque ha sido la técnica más sencilla y la más utilizada para la síntesis de MIPs. El procedimiento consiste en preparar una disolución que contiene todos los componentes de la mezcla y, una vez eliminado el oxígeno, se lleva a cabo la polimerización. Se obtiene como resultado un bloque que después ha de ser triturado y tamizado (Figura 25a).³²⁵ Los principales problemas de este formato son: la formación de finos y la pérdida de sitios de unión tras la molturación, así como la heterogeneidad del tamaño de las partículas obtenidas.

Este método también se ha utilizado para la polimerización “*in situ*” dentro de columnas capilares para su aplicación en electroforesis capilar (Figura 25b)³²⁶ o como recubrimiento de fibras utilizadas para microextracción en fase sólida (SPME),³²⁷ obteniéndose materiales porosos que evitan los problemas derivados de la molturación.

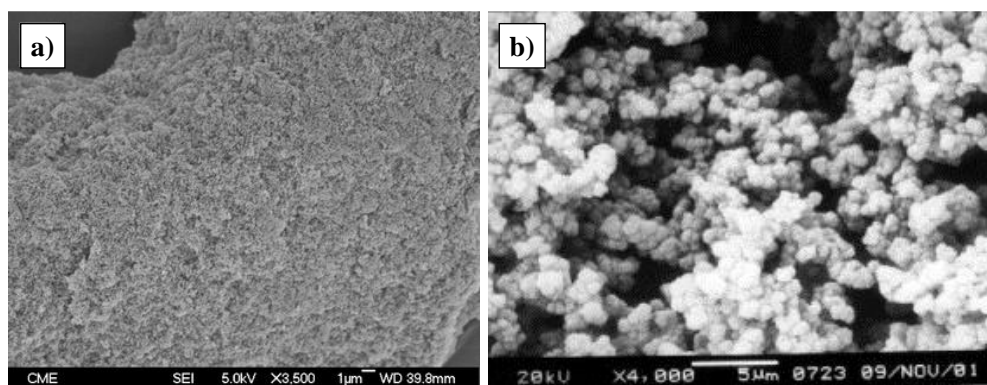


Figura 25. Micrografías SEM de: a) MIP sintetizado en forma de bloque, tras su triturado y tamizado, para el reconocimiento del antibiótico enrofloxacino, reproducida con permiso de la referencia 325; b) Monolito MIP que recubre las paredes interiores de una columna cromatográfica para la separación quiral de aminoácidos, reproducida con permiso de la referencia 326.

5.4.5.2. Partículas esféricas

Una de las áreas de investigación a las que se ha dedicado mayor esfuerzo en los últimos años es la fabricación de MIPs en forma de partículas esféricas de tamaño uniforme y con una mejor transferencia másica. La síntesis en formato de esferas ha permitido solventar algunos problemas relacionados con la polimerización en bloque, como la

pérdida de sitios de unión derivados de la molturación, la falta de homogeneidad de las partículas obtenidas y la reducida área superficial eficaz de las mismas. En general, el trabajo se ha dirigido a la fabricación de esferas de tamaño nano y micrométrico utilizando diferentes técnicas, que se describen a continuación.

- A. Polimerización por precipitación. Se trata del procedimiento más sencillo para la obtención de partículas esféricas de MIP en tamaños nano y micrométricos. La manera obtener estos materiales es análoga a la síntesis en bloque, pero utilizando disoluciones más diluidas en las que la relación monómeros/disolvente sea $< 5\%$ (p/v). En este medio, las cadenas poliméricas no coagulan, sino que adicionan monómeros y oligómeros hasta tener un tamaño tal que las hace insolubles y precipitan. De esta manera se origina una dispersión de partículas independientes con una distribución de tamaños uniforme. Aparte de la monodispersidad, estos materiales presentan mayor capacidad de carga y una distribución más homogénea de los sitios de unión que los polímeros en bloque, además de que se pueden sintetizar de manera rápida y sencilla. Sin embargo, es necesario optimizar todas las variables que afectan al proceso de polimerización para poder obtener partículas esféricas del tamaño deseado, con especial atención en el porogeno, el cual resulta crítico en este tipo de polimerizaciones, el entrecruzante, y el empleo de monómeros funcionales que formen un complejo estable con la plantilla en condiciones muy diluidas (Figura 26a).³¹⁰
- B. Polimerización mediante suspensión. La síntesis mediante esta técnica se basa en la mezcla de dos fases inmiscibles: una orgánica discontinua que contiene la mezcla de prepolimerización y otra continua que se encuentra en mayor proporción. La agitación permite la formación de microgotas en el seno de la fase continua, estabilizadas mediante un surfactante, que permiten la formación de microesferas de MIP, altamente entrecruzadas, con un diámetro del orden de μm . El tamaño de estas partículas se puede controlar mediante el agente estabilizador y la velocidad de agitación, aunque por lo general se obtienen partículas con un elevado índice de polidispersidad (Figura 26b).³²⁸
- C. Polimerización mediante emulsión. A fin de obtener esferas con un tamaño submicrométrico se han desarrollado técnicas de polimerización en microemulsión inversa. En esta técnica se generan micelas estabilizadas con surfactantes, que no

requieren el uso de disolventes orgánicos y que contienen a los monómeros.³²⁹ Aunque mediante esta técnica se logran partículas con bajos índices de polidispersidad y con tamaños de hasta 30 nm, el uso de los surfactantes o del agua pueden interferir en la impronta provocando la generación de sitios de unión de baja afinidad o afectando a las interacciones en el complejo plantilla-monómero funcional.

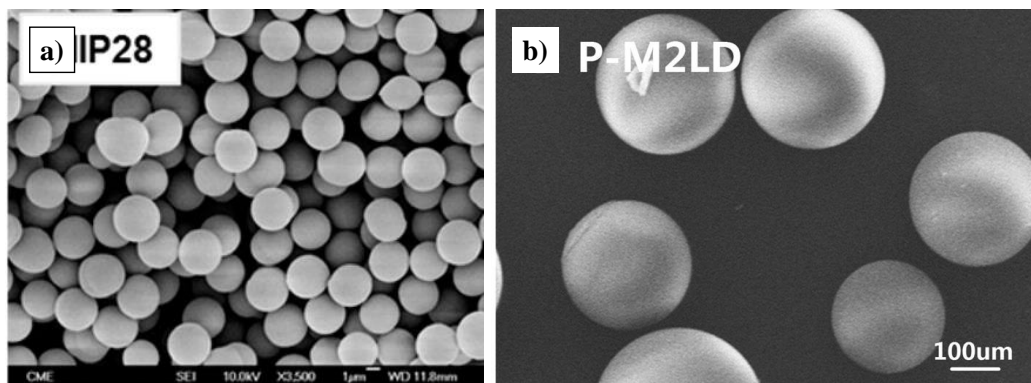


Figura 26. Micrografías SEM de MIPs obtenidos mediante polimerización: a) Por precipitación selectivo a enrofloxacin, reproducido con permiso de la referencia 310; b) En suspensión selectivos a Boc-Pro, reproducida con permiso de la referencia 330.

5.4.5.3. Síntesis por moldeo

En este tipo de aproximaciones los MIPs se sintetizan empleando moldes, de manera que se obtienen polímeros con una forma definida o con ciertas características especiales como la porosidad o la impronta superficial. A continuación, se detallan algunas técnicas de las más utilizadas para esta síntesis.

- A. Polimerización mediante hinchamiento por pasos. En este método es necesario sintetizar partículas de látex o poliestireno en medio acuoso seguido de un proceso de hinchamiento mediante la formación de microemulsiones con un plastificante. A continuación, se añade la mezcla de prepolimerización y se lleva a cabo la síntesis (Figura 27a).³³¹ Este procedimiento se repite tantas veces como sea necesario hasta lograr el tamaño de partícula deseado. Las principales limitaciones de este método son los largos tiempos de síntesis y la posibilidad de que aumente la polidispersidad al repetirse el proceso de síntesis.
- B. Polimerización sobre molde de sílica sacrificable. En esta aproximación, la mezcla de prepolimerización se pone en contacto con partículas porosas de gel de sílice embebiéndose dentro del molde antes de su polimerización. Una vez obtenido el

material compuesto se lleva a cabo la disolución del gel de sílice mediante un tratamiento con ácido fluorhídrico o derivados, de manera que al final se obtienen esferas de MIPs porosas, cuyo tamaño depende del molde utilizado (Figura 27b). Debido a la elevada área superficial que presentan, derivada de su porosidad, y al mantenimiento de la integridad de los sitios de unión, se trata de materiales muy indicados para su uso en cromatografía o en SPE.³³²

- C. Síntesis de nanofilamentos. El método más utilizado para la síntesis de estas nanoestructuras se basa en el uso de moldes sacrificables de óxido de aluminio. El tamaño y la distribución espacial de los filamentos se controla mediante los poros generados en el molde durante un proceso de electro-oxidación. Antes de rellenar los poros con la mezcla de prepolimerización, se puede funcionalizar la superficie de los mismos con la molécula plantilla para llevar a cabo una impronta superficial. Tras polimerizar, se disuelve el molde de manera que se obtiene un negativo de la alúmina (Figura 27c). La principal ventaja de esta aproximación reside en que la impronta superficial permite una mayor accesibilidad del analito a las cavidades específicas.³³³ Cabe mencionar que es posible sintetizar nanofibras mediante otras técnicas que no se basan en el moldeo, como por ejemplo el electrohilado.³³⁴

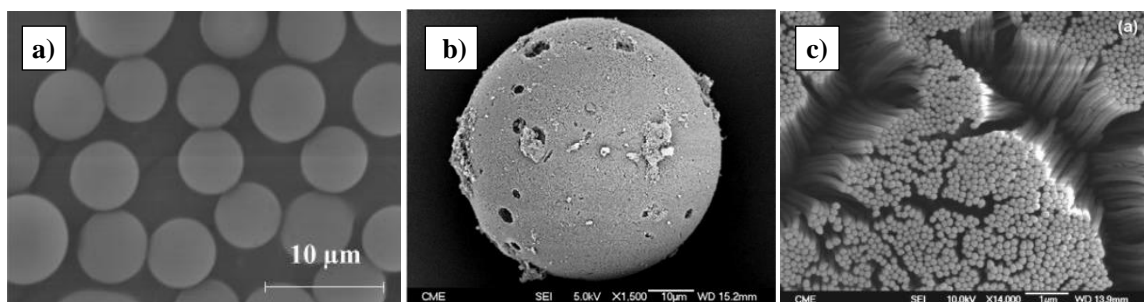


Figura 27. Micrografías SEM de a) Partículas esféricas sintetizadas mediante hinchamiento por pasos selectivas a coumaclor, reproducida con permiso de la referencia 331; b) Partículas esféricas porosas sintetizadas utilizando un molde sacrificable de sílica selectivas a fluoroquinolonas, reproducida con permiso de la referencia 332; c) Nanofilamentos de MIP, selectivos a enrofloxacin, obtenidos empleando un molde de Al_2O_3 . Reproducida con permiso de la referencia 333.

5.4.5.4. Partículas núcleo-recubrimiento

En los últimos años se ha trabajado en la combinación de los MIPs con otros materiales, que no presentan propiedades de reconocimiento selectivo, pero muestran otras características interesantes de gran utilidad analítica. Los materiales compuestos obtenidos suelen ser del tipo núcleo-recubrimiento y en ellos el núcleo es un material que

sirve de semilla o anclaje para el crecimiento del MIP que actúa como recubrimiento. Existen diversas técnicas para sintetizar estos materiales, siendo las más utilizadas la polimerización por emulsión y el crecimiento de polímero mediante polimerizaciones controladas por transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT, del inglés *reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization*).

La gran ventaja de estos procedimientos de síntesis es la posibilidad de controlar el espesor de las capas de MIP generadas sobre el núcleo. Además, se pueden aprovechar las propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas de los núcleos para facilitar la detección y/o separación de analito, incluso en matrices complejas. En la bibliografía es posible encontrar diversos ejemplos de partículas núcleo-recubrimiento utilizando como núcleo sílice dopada con una molécula fluorescente (Figura 28),³³⁵ partículas o nanohilos magnéticos de Fe_3O_4 ,¹¹³ puntos cuánticos (*quantum dots*)³³⁶ o nanoestructuras de oro,²⁸⁸ de manera que se complementa el reconocimiento selectivo con las propiedades que estos núcleos aportan.

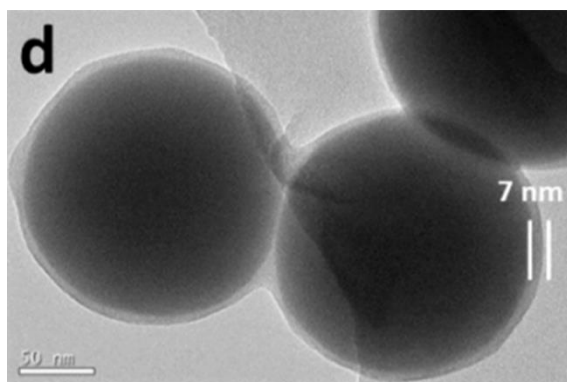


Figura 28. Micrografías TEM de partículas núcleo-recubrimiento. El núcleo de gel de sílice está dopado con tris(1,10-fenantrolina)rutenio(II) y se recubre de un MIP selectivo a enrofloxacin. Reproducida con permiso de la referencia 335.

5.4.5.5. Membranas e hidrogeles

La síntesis de membranas se puede hacer polimerizando directamente una fina capa de la mezcla de prepolimerización o embebiéndola en un soporte. En la primera aproximación la mezcla de prepolimerización se dispone entre dos placas o discos, separadas por un espaciador, que se eliminan tras la polimerización. Alternativamente puede emplearse el método de la inversión de fase, en el que los monómeros se encuentran disueltos en un disolvente adecuado y al entrar en contacto con la plantilla, se produce la polimerización con una conformación determinada, evaporándose finalmente el

disolvente. Como segunda aproximación la mezcla de prepolimerización se puede incorporar en los poros o impregnar la superficie de una membrana porosa, que puede ser de diversos materiales como por ejemplo celulosa.³³⁷ Los MIPs obtenidos mediante esta aproximación puede emplearse tanto para extracción en fase sólida como para la fabricación de sensores.

Una variante de este tipo de materiales son los hidrogeles. Se trata de matrices poliméricas poco entrecruzadas lo que facilita su hinchamiento en presencia de agua sin que se produzca su disolución. Generalmente se utilizan para la liberación controlada de sustancias en medios biológicos o en alimentos, por lo que es necesario asegurar que todos sus componentes son biocompatibles y no presentan problemas de toxicidad en caso de migraciones indeseadas. Uno de los monómeros más utilizados para la síntesis de los hidrogeles es el metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA).³³⁸

5.4.5.6. Nanogeles

En los últimos años se ha trabajado en el desarrollo de materiales de tamaño nanométrico que presentan características muy similares a los anticuerpos. Los nanogeles son materiales con un bajo grado de entrecruzamiento que carecen de forma definida, pero presentan una capacidad de reconocimiento y estabilidad elevados. Se suelen sintetizar mediante precipitación en presencia de una elevada cantidad de disolvente³³⁹ o empleando agentes controladores de la polimerización, tipo RAFT,³⁴⁰ de forma que el tamaño de las partículas obtenidas suele estar comprendido entre 10 y 300 nm (Figura 29a).

Recientemente se ha desarrollado una nueva metodología para sintetizar nanoMIPs empleado impronta en estado sólido (Figura 29b).³⁰⁰ En este método la plantilla se inmoviliza sobre un soporte sólido que actúa como núcleo de polimerización. La afinidad de los nanoMIPs obtenidos por la molécula plantilla condiciona su elución del soporte en condiciones de lavado más o menos agresivas, lo que permite separar los materiales en distintas fracciones dependiendo de su capacidad de unión selectiva. El hecho de tener la plantilla inmovilizada permite realizar la síntesis de los polímeros tanto en medio acuoso, adecuado para péptidos y proteínas, como en medio orgánico, especialmente adecuado para moléculas pequeñas.³⁴¹ Además, es posible modificar posteriormente los materiales sintetizados sin afectar a la cavidad específica, pues ésta queda protegida por la plantilla.³⁴²

Otra gran ventaja de este método es la posibilidad de automatizar la síntesis y purificación de los polímeros empleando un reactor controlado por ordenador, lo que facilita su producción a gran escala.³⁰⁰

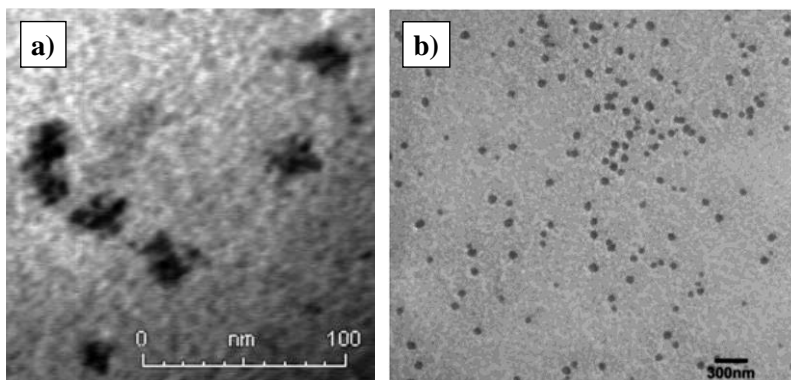


Figura 29. Micrografías SEM de MIPs en formato de nanogel: a) Con actividad tipo Aldolasa I sintetizados mediante el uso de agentes RAFT con un tamaño de 20 nm, reproducido con permiso de la referencia 339; b) Selectivos a tripsina sintetizados mediante la impronta en estado sólido con un tamaño de 100 nm, reproducido con permiso de la referencia 300.

Estos nanogeles presentan constantes de unión cercanas a las de los anticuerpos además de una gran estabilidad en diferentes medios y una adecuada transferencia de masa. Los nanoMIPs se han aplicado en catálisis y sensado de moléculas a niveles de concentración picomolar.³⁴³

5.4.6. Técnicas de caracterización de los polímeros de impronta molecular

A diferencia de otro tipo de materiales poliméricos, los MIPs son sólidos amorfos y generalmente insolubles, con una estructura muy heterogénea. Para llevar a cabo su caracterización se emplean, principalmente, las técnicas descritas a continuación.

5.4.6.1. Caracterización química

Debido a la baja solubilidad de los MIPs, con excepción de los nanogeles, las técnicas utilizadas para su caracterización química son las empleadas para el análisis de sólidos.

A. Microanálisis elemental. Se trata de una técnica destructiva que permite obtener el porcentaje total en masa de ciertos elementos como C, H, N o S, entre otros. Permite evaluar la cantidad de un determinado monómero incorporado en la red polimérica, (siempre que contenga heteroátomos característicos) evaluar si se ha disuelto correctamente el soporte sobre el que se ha realizado la polimerización y determinar si

se ha eliminado correctamente la molécula plantilla del material.³⁴⁴ Sin embargo, se trata de una técnica poco sensible que puede llevar asociado un error elevado.

- B. Espectroscopia infrarroja (FTIR y ATR). Es una técnica no destructiva que proporciona información acerca de la composición del material. Es posible evaluar la presencia de determinados grupos funcionales en la red polimérica³⁴⁵ o la existencia de enlaces de hidrógeno.³⁴⁶ Sin embargo, es una técnica de utilidad limitada, debido a su baja sensibilidad, y a que la información que aporta es cualitativa o semi-cuantitativa.
- C. Resonancia magnética nuclear (RMN) de estado sólido. Se trata de una herramienta de gran utilidad para el estudio no destructivo de los polímeros tanto en disolución, como se comentó en el apartado 5.1.6.2., como en estado sólido. Mediante ¹³C-RMN de sólidos es posible controlar el progreso de la reacción y determinar el número de dobles enlaces que aún no han reaccionado.³⁴⁷ Además, permite obtener información acerca de los grupos funcionales, que contienen carbono, y sobre los diferentes sitios de unión.³⁴⁸ Sin embargo, el número de aplicaciones de esta técnica para la caracterización de los MIPs es aún limitado.
- D. Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). Se trata de una técnica que permite el análisis de la superficie de un material mediante irradiación con rayos X. Sirve para estimar la estequiometría, el estado químico y la estructura electrónica de los elementos que componen el MIP. Se ha utilizado, principalmente, para llevar a cabo un seguimiento de la modificación de superficies con MIPs³⁴⁹ y para evaluar la generación de cavidades de reconocimiento selectivo.³⁵⁰
- E. Espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV-VIS), fluorescencia y fosforescencia. En principio se trata de técnicas no destructivas que permiten evaluar la interacción del analito con el polímero. Para ello es necesario que se produzca una modificación de las características ópticas del material en la interacción, por ejemplo un cambio de color³⁵¹ o la emisión de fluorescencia.³¹²

5.4.6.2. Caracterización morfológica

En general, las técnicas utilizadas para la caracterización morfológica de los MIPs son las mismas que se emplean para otros tipos de materiales porosos. La información obtenida dependerá de la técnica utilizada, pudiéndose determinar el área superficial específico del polímero, la distribución de tamaños, el diámetro y volumen de poro o la

morfología superficial, entre otras. A continuación, se describen las técnicas más habituales empleadas en la caracterización morfológica de los MIPs.

- A. Microscopía electrónica. Permite obtener la distribución de tamaño de polímeros entrecruzados en seco, sin influencia del disolvente. Se divide en microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) y de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*). La primera técnica permite obtener información estructural sobre la superficie del material como por ejemplo la morfología, la rugosidad y la porosidad.³³² La segunda ofrece información acerca del material en profundidad, lo que la hace especialmente indicada para las partículas núcleo-recubrimiento, permitiendo conocer los espesores de las capas creadas.³³⁵ En ambos casos, la cantidad de material que se necesita para el análisis es pequeña, en comparación con otras técnicas. Acompañando a estas técnicas microscópicas es posible realizar el microanálisis elemental de zonas puntuales mediante el uso de la espectroscopía dispersiva de rayos X (EDX, del inglés *energy dispersive X-ray spectroscopy*), que permite obtener información semicuantitativa sobre los elementos presentes en la zona de análisis.
- B. Cromatografía de exclusión molecular (ISEC). También conocida como cromatografía de permeación de gel (GPC, del inglés *Gel Permeation Chromatography*), se trata de una cromatografía de exclusión por tamaños. Permite conocer la distribución de tamaños y el peso molecular de polímeros solubles, generalmente de cadenas lineales.³⁵² También existen ejemplos de su aplicación con polímeros entrecruzados de tamaño nanométrico.³⁵³
- C. Porosimetría de adsorción/desorción de nitrógeno. En esta técnica el material se expone a una corriente de nitrógeno a diferentes presiones. Representando la cantidad de nitrógeno adsorbido en función de la presión aplicada es posible obtener las isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno del material. De esta manera se obtiene información sobre el área superficial específica ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), el volumen específico de poro ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$), el diámetro medio de los poros y su distribución de tamaños. Es útil para el análisis de microporos ($< 2 \text{ nm}$) y mesoporos ($2 - 50 \text{ nm}$).³⁵⁴
- D. Porosimetría de intrusión/extrusión de mercurio. Se obtiene una información similar a la suministrada por la técnica anterior. En este caso se obliga al mercurio a pasar a

través de los poros del material a diferentes presiones, obteniéndose las isothermas de intrusión/extrusión. Se recurre a esta técnica cuando se precisa mayor sensibilidad en lo que respecta al tamaño de poro ($> 50 \text{ nm}$).³⁵⁵

- E. Microscopía de fuerza atómica (AFM). Se trata de una técnica, no muy utilizada en la caracterización de MIPs, que proporciona un perfil topográfico, a escala nanométrica, de una superficie. Permite obtener información acerca de la composición, la cristalinidad y el grado de funcionalización.³⁴⁹
- F. Análisis termogravimétrico (TGA). Se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando es sometida a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Esta técnica se utiliza para evaluar la estabilidad térmica de los MIPs, observándose un gran salto, correspondiente a la pérdida de masa, cuando la matriz entrecruzada se piroliza. Por lo general, los MIPs presentan una mayor discontinuidad estructural en comparación con los NIPs, debido a la presencia de las cavidades de reconocimiento, lo que se traduce, generalmente, en una mayor inestabilidad térmica en comparación con los materiales no improntados, hecho verificable mediante el uso de esta técnica.³⁵⁶ El principal problema del TGA reside en que es destructiva y requiere cantidades relativamente grandes de polímero.
- G. Microscopía óptica. Aunque se trata de una técnica que proporciona una información limitada sobre la morfología de estos materiales, es posible realizar medidas de campo oscuro³⁵⁷ o de fluorescencia confocal,³⁵⁸ evaluando las propiedades luminiscentes de las partículas o superficies improntadas.
- H. Ángulo de contacto. Permite evaluar los cambios en la hidrofobicidad/hidrofiliidad producidos en una superficie tras una síntesis sobre las que se ha generado una membrana o un recubrimiento MIP.³⁵⁹
- I. Dispersión dinámica de luz (DLS). Proporciona información sobre el tamaño hidrodinámico de partículas, generalmente esféricas.³⁴² También permite obtener información acerca del potencial ζ (zeta) de las superficies de estas partículas.³⁶⁰

5.4.6.3. Caracterización de los sitios de unión específica. Isothermas de adsorción

La síntesis de los MIPs lleva implícita la heterogeneidad de los sitios de unión específica. Como ya se comentó anteriormente, el modelo covalente permite obtener distribuciones más homogéneas, pero con la aproximación no-covalente es imposible. Por

todo ello es necesario llevar a cabo un estudio de los mecanismos de adsorción y retención del material, lo que permite determinar, en ciertos casos, la presencia de diferentes sitios de unión e, incluso, su existencia o no en función de si el material está improntado.

Para evaluar la selectividad de los MIPs, las constantes de afinidad y la densidad de los sitios de unión, se recurre a las isothermas de adsorción. Se trata de modelos matemáticos que relacionan la cantidad de plantilla unida, B , y libre, F , para una determinada cantidad de polímero e intervalo de concentraciones de ésta. Cabe destacar que el sistema debe encontrarse termodinámicamente en equilibrio, ya que la idoneidad del ajuste depende de muchos factores.

Existen diferentes modelos de isothermas de adsorción que se pueden aplicar para la caracterización de los MIPs y que proporcionan información de los fenómenos que ocurren. En función de si considera a la distribución de los sitios de unión como algo finito con diferente afinidad o infinito, se les considera discretos o continuos, respectivamente. En la Tabla 9 se recogen los modelos más utilizados para el ajuste de los datos de adsorción en los MIPs.³⁶¹

Tabla 9. Principales modelos de isothermas de adsorción de tipo discreto y de distribución continua.

	Isoterma	Ecuación
Modelos discretos	Langmuir	$B = \frac{qkF}{1 + kF}$
	Bi-Langmuir	$B = \frac{q_1 k_1 F}{1 + k_1 F} + \frac{q_2 k_2 F}{1 + k_2 F}$
	Jovanovic	$B = q(1 - e^{-kF})$
	Bi-Jovanovic	$B = q_1(1 - e^{-k_1 F}) + q_2(1 - e^{-k_2 F})$
Modelos continuos	Freundlich	$B = aF^n$
	Freundlich-Langmuir	$B = \frac{qkF^n}{1 + kF}$
	Freundlich-Jovanovic	$B = q(1 - e^{-kF^n})$

a: Factor preexponencial que indica el número de sitios de unión y la afinidad media de la red; B: fracción de analito unida a un polímero; F: fracción de analito libre en disolución; k: constante de asociación.

Los modelos de Langmuir y Jovanovic simplifican el tipo de unión en los polímeros ya que solo consideran una constante de afinidad sin tener en cuenta la heterogeneidad de

los sitios de unión. Sin embargo, los modelos bi-Langmuir y bi-Jovanovich consideran la existencia de dos tipos de sitios de unión, de alta y baja afinidad, que pueden dar una información más exacta que los modelos sencillos.

El modelo de Langmuir es el más sencillo de todos y considera una distribución infinita de sitios de unión en el material. Además, incluye el parámetro de heterogeneidad, n , cuyo valor está comprendido entre 0 y 1, de manera que cuanto más cercano es a la unidad, más homogénea será la distribución de los sitios de unión. Gracias al parámetro a , es posible calcular el número de sitios de unión y la constante de afinidad.

Existen modelos combinados entre la distribución continua de Freundlich y la homogeneidad de los modelos de Langmuir y Jonanovic. El modelo Freundlich-Langmuir describe las regiones de alta y baja afinidad del polímero. Sin embargo, es muy común que las isothermas de adsorción de los MIPs se hagan en la zona de baja saturación donde el comportamiento es el correspondiente a una isoterma de Freundlich a bajas concentraciones.

5.4.7. Aplicaciones de los polímeros de impronta molecular

Debido a la versatilidad que ofrecen los MIPs en cuanto a formato y selectividad se han desarrollado diversas aplicaciones de los mismos a lo largo de los años. De hecho, la síntesis de nuevos materiales o nuevos formatos está impulsada, generalmente, por la aplicación final.

5.4.7.1. Técnicas de separación

Debido a que gran parte de los métodos de separación utilizados en química analítica están basados en técnicas cromatográficas, los MIPs se han aplicado tradicionalmente a este tipo de separaciones. En los trabajos iniciales los MIPs sintetizados en formato de monolito, una vez molturados y tamizados, se empaquetaban en la columna cromatográfica.³⁶² Sin embargo, esta aproximación conducía a la obtención de partículas irregulares que originaban empaquetamientos poco reproducibles y de poca eficiencia. Es por ello que, en los últimos años, se ha trabajado en la síntesis de monolitos de MIPs directamente en el interior de una columna.³²⁶ Otra alternativa ha sido el uso de partículas esféricas cuya síntesis permite obtener distribuciones de tamaños más homogéneas y, por tanto, empaquetamientos más reproducibles.³⁶³ En un principio, se emplearon para la

separación de enantiómeros y, de hecho, aún se siguen desarrollando materiales para este fin.³⁶² Combinando las capacidades de los MIPs como adsorbentes y la separación electroforética, se han desarrollado MIPs para su utilización en electrocromatografía capilar (CEC, del inglés *capillary electrochromatography*). Sin embargo, no se trata de una de las aplicaciones más utilizadas y, de hecho, en ocasiones queda relegado a la evaluación de los MIPs sintetizados para otras aplicaciones, empleando cromatografía frontal.¹¹³

Una de las aplicaciones más extendidas de los MIPs es su uso como materiales para la extracción en fase sólida (MISPE, del inglés *molecularly imprinted solid phase extraction*). Estos materiales se pueden empaquetar en una columna de HPLC para su empleo en sistemas en línea (*on-line*), o en cartuchos, entre dos fritas, para ser utilizados en modo discontinuo u “*off-line*”. En el primer caso, al tratarse de un método automatizado es posible reducir la manipulación de muestras diferentes, logrando mayores recuperaciones y reduciendo los riesgos de contaminación. No obstante, el método *off-line* es el más utilizado debido a su versatilidad y simplicidad.³⁶⁴ En la Figura 30 se muestra un esquema de las etapas implicadas en el proceso MISPE.

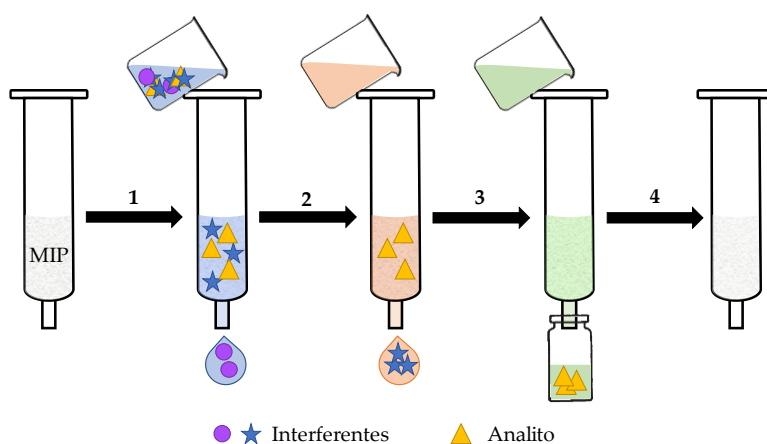


Figura 30. Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida empleando un MIP como adsorbente (MISPE). El procedimiento es análogo al de una SPE convencional. En un cartucho con el MIP empaquetado y acondicionado se siguen los siguientes pasos: 1) Carga de la muestra; 2) Lavado para eliminar interferentes retenidos en el MIP de manera no selectiva; 3) Elución del analito retenido selectivamente, y 4) Regeneración del cartucho MISPE.

Últimamente se ha avanzado en la aplicación de los MIPs para este fin, pero en formatos diferentes que mejoren la extracción. Entre estas técnicas es posible encontrar la microextracción en fase sólida (SPME), donde el MIP se deposita sobre una fibra;³²⁷ adsorción sobre barra agitadora (SBSE), utilizando una barra magnética cubierta del

material;³⁶⁵ o la síntesis de partículas magnéticas recubiertas de MIP que permiten agilizar el procedimiento de lavado y elución utilizando un imán para contenerlas.¹¹³

El uso de MIPs en técnicas de separación ha supuesto un avance tal en el desarrollo de los métodos analíticos que su comercialización empieza a estar generalizada. De hecho, han permitido mejorar las prestaciones de los cartuchos clásicos de SPE, logrando mejores resultados gracias a su especificidad. Aunque el número de analitos es aún relativamente reducido, en la Tabla 10 se recogen diversos ejemplos de aplicaciones comerciales de los MIPs en técnicas de separación.

5.4.7.2. Catálisis y síntesis

Existe un gran interés por parte de los investigadores en emular a los catalizadores biológicos para mejorar la eficiencia de las reacciones químicas, y conocer como transcurren los procesos catalíticos. Los MIPs son capaces de mimetizar la selectividad y la estereoespecificidad de los sitios de unión de las enzimas en determinadas reacciones. De esta manera es posible orientar las moléculas en las cavidades de unión selectiva permitiendo que se produzca la reacción entre ellas y reduciendo el tiempo necesario para que se produzca la reacción. Se han descrito dos aproximaciones para sintetizar este tipo de materiales. En el primer caso se genera el sitio activo utilizando una molécula estructuralmente similar al estado de transición de la reacción catalizada, favoreciendo su formación por la disposición concreta de los grupos funcionales y la morfología en el sitio activo. No obstante, algunos autores han utilizado, en lugar de un análogo al estado de transición, los sustratos o los productos implicados en la catálisis. En la segunda, se impronta un complejo, formado generalmente por un metal y las moléculas que interaccionan con el mismo, de manera que se genera un microentorno similar al centro activo de las enzimas.³⁷⁹

La elección de la plantilla depende del planteamiento de la reacción y de las necesidades de cada situación concreta, siendo necesario conocer, en cualquier caso, tanto la reacción como sus etapas, para elegir la mejor aproximación.³⁸⁰ En los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de enzimas artificiales basadas en MIPs aplicándose a reacciones de hidrólisis, oxidación, reducción y eliminación o formación de enlaces carbono-carbono, entre otras.³⁸¹⁻³⁸⁴ En la Figura 31 se muestra un ejemplo del uso de un MIP como catalizador.

Tabla 10. Resumen de los cartuchos comerciales basados en MIPs utilizados en aplicaciones MISPE.

Casa comercial	Analitos objetivo	Matriz*
Biotage (Affinilute MIP)	Clembuterol	Orina
	Beta-agonistas	Orina y fluidos biológicos
	Nitrosaminas	Orina y fluidos biológicos
	Triazinas	Agua
	Cloranfenicol	Alimentos y fluidos biológicos
	Betabloqueantes	Fluidos biológicos
	Anfetaminas	Orina
	Nitroimidazoles	Leche, agua, medicinas veterinarias
	Fluoroquinolonas	Alimentos y tejidos animales
	NSAIDs	Agua, tejidos y fluidos biológicos
	PAHs	Aceites vegetales
Sigma-Aldrich (SupelMIP®)	NSAIDs	Tejidos musculares, agua, orina ³⁶⁶
	Nitroimidazoles	Leche y huevos
	PAHs	Aceites comestibles y bebidas ³⁶⁷
	Fluoroquinolonas	Alimentos de origen animal ³⁶⁸
	Clembuterol	Muestras biológicas ³⁶⁹
	Beta-agonistas	Muestras biológicas
	Beta-receptores	Orina y aguas residuales ³⁷⁰
	Cloranfenicol	Muestras biológicas
	Nitrosaminas	Fluidos biológicos
	Patulina	Frutas y derivados
	Riboflavina	Leche y muestras acuosas
	Aminoglucósidos	Tejidos animales, miel y cultivos celulares
	Bisfenol A	Matrices basadas en leche o suero
	Anfetamina	Agua y orina ³⁷¹
Toximet**	Aflatoxinas Fumonisinias	Semillas, especias, cereales y frutos secos ³⁷²
AFFINISEP (AFFINIMIP®)	Patulina	Manzana y derivados ¹¹⁴
	Zearalenona	Alimentos ³⁷³
	Ocratoxina A	Alimentos ³⁷⁴
	Fumonisinias	Cereales ³⁷⁵
	Deoxivalenol	Alimentos animales y humanos
	Bisfenol A	Bebidas y fluidos biológicos ³⁷⁶
	Estrógenos	Agua y fluidos biológicos ³⁷⁷
	Cloranfenicol	Alimentos y fluidos biológicos
	Anfetaminas	Suero y orina
	Tetraciclinas	Carne
	Metanefrinas	Plasma
	Catecolaminas	Orina ³⁷⁸
	Herbicidas picolínicos	Agua, compost y suelo
	PAHs	Aceites comestibles

*Matrices especificadas por la casa comercial; **Detección cuantitativa fluorescente con un detector especial.
NSAIDs: antiinflamatorios no esteroideos; PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

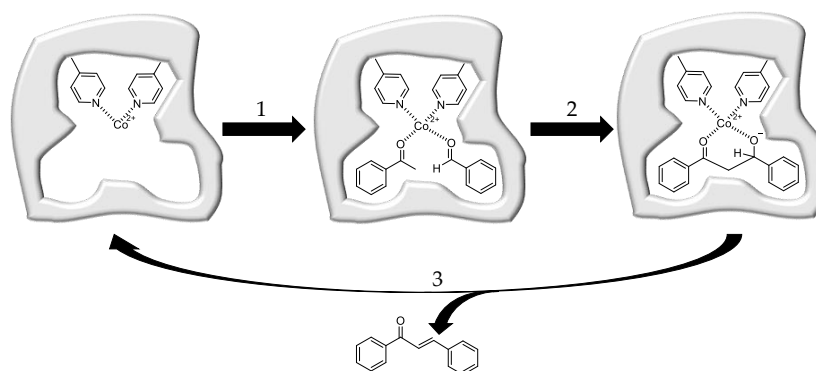


Figura 31. Esquema del uso de un MIP como catalizador para la síntesis de Chalcona. Tras la incorporación del ion cobalto el polímero: 1) Se incuba con los reactivos de partida, acetofenona y benzaldehído; 2) Tras la formación del complejo de coordinación se produce la enolización y la adición nucleófila formándose un intermedio de reacción; 3) Finalmente se produce la deshidratación obteniéndose el producto final, el cual únicamente tiene un punto de unión con el sitio de reconocimiento, y se extrae del polímero regenerando el centro catalítico. Adaptación de la referencia 381.

5.4.7.3. Biorremediación

La aparición de contaminantes emergentes en aguas potables y residuales se ha convertido en un problema para la salud y la estabilidad de los ecosistemas. Este tipo de compuestos, entre los que se incluyen residuos farmacéuticos, químicos y pesticidas se encuentran generalmente a nivel de trazas, pero pueden resultar muy perjudiciales por su bioacumulación y por los efectos negativos que pueden ejercer sobre la salud de los seres vivos.³⁸⁵ Actualmente se está haciendo un esfuerzo importante en la búsqueda de métodos que ayuden a su eliminación, entre ellos, el desarrollo de MIPs.³⁸⁶ Dado que se pretende aplicarlos en sistemas naturales, es necesario asegurar que estos materiales sean compatibles con el medio ambiente y no produzcan efectos negativos sobre el mismo. Por esta razón, suelen estar contenidos o soportados en una membrana o en algún tipo de soporte que evite su pérdida al exterior. Dado que suelen estar en contacto con el agua es necesario evaluar los efectos que este medio tiene sobre el polímero y su funcionamiento, por ejemplo, el efecto del pH, de la fuerza iónica o de la presencia de otros componentes presentes en las aguas. También es necesario tener en cuenta su capacidad de regeneración y reutilización de manera que se reduzcan costes.³⁸⁷ Una de las grandes ventajas de los MIPs para esta aplicación es que pueden ser diseñados para eliminar un grupo específico de contaminantes, a diferencia de otros materiales que se consumen con contaminantes que no están a nivel de traza.

5.4.7.4. Transporte y liberación de sustancias

Una de las últimas aplicaciones de los MIPs es la liberación controlada de fármacos o sustancias. El desarrollo de materiales para este fin se basa en la unión selectiva de estos compuestos a los MIPs y la alta afinidad que presentan, lo que permite una elevada carga del material y una liberación prolongada en el tiempo del compuesto deseado en el tiempo, que puede ser promovida por algún estímulo externo o simplemente por difusión.³⁸⁸

Su aplicación principal es la liberación de medicamentos de manera controlada, es decir, en el sitio indicado, la cantidad adecuada y durante un periodo de tiempo estipulado. Se han desarrollado materiales de liberación de medicamentos para su utilización por vía transdérmica,³⁸⁹ ocular³³⁸ u oral.³⁹⁰ Sin embargo, también se ha explorado la posibilidad de aplicar estos materiales a los embalajes de alimentos de manera que se extienda la vida útil de los mismos.²⁷⁰ En la Tabla 7 se resumen algunos ejemplos de MIPs aplicados a la liberación controlada de compuestos de interés.

Tabla 11. Resumen de MIPs utilizados para la liberación controlada de sustancias.

Molécula	Formato	Aplicación	Control de la liberación	Ref.
Nicotina	Hidrogel (Parches)	Liberación transdérmica	Difusión libre	389
Timolol	Hidrogel (lentillas)	Liberación ocular	Difusión libre	338
Levofloxacin	MWCNTs recubiertos de polímero cristalino	Liberación gástrica	Difusión libre	390
Metronidazol	Partículas esféricas	Liberación gástrica	Control por pH	391
Fenazona	Partículas SiO ₂ @MIP	n.d.	Control por pH y fuerza iónica	392
Furosemida	Polímero basado en celulosa	n.d.	Difusión libre	393
Gatifloxacin	Hidrogel	Liberación gástrica	Control por pH y temperatura	394
Ác. ferúlico	Hidrogel	Envase activo	Difusión libre	252,270

n.d.: no descrito; SiO₂: sílice; MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple.

La gran precaución que hay a la hora de aplicar este tipo de materiales es la biocompatibilidad, ya que de un modo u otro van a estar en contacto con seres vivos o alimentos y es necesario asegurar que no tengan efectos adversos para la salud.

5.4.7.5. Sensores

Los sensores (bio)químicos son dispositivos analíticos que proporcionan información (semi)cuantitativa sobre la presencia de un compuesto específico en una muestra compleja. Se basan en el empleo de un elemento de reconocimiento (bio)químico en contacto con un transductor que puede ser de diversos tipos, como óptico, electroquímico, térmico o de masa. La necesidad de fabricar dispositivos que permitan el diagnóstico rápido, selectivo, con una buena relación coste-efectividad, que sean robustos, estables y fáciles de construir a gran escala, ha favorecido la aplicación de los MIPs en este campo. En este tipo de sensores el MIP se encuentra en contacto con el transductor, siendo la etapa de integración uno de los principales obstáculos para la aplicación de estos materiales a gran escala en sensores. Sin embargo, gracias al desarrollo de nuevos monómeros, técnicas de polimerización y, sobre todo, a la micro/nanoestructuración de los MIPs, se ha avanzado enormemente en este campo. Estos avances han permitido solventar algunas limitaciones de los MIPs como las lentas cinéticas de unión, la heterogeneidad en los sitios de unión y su limitada aplicabilidad en medios acuosos. En cualquier caso, los MIPs deben prepararse en el formato adecuado para que, tras su acoplamiento al transductor, se genere una señal química cuantificable cuando se establezca la interacción entre el analito y el receptor.³⁹⁵ Entre las ventajas de la aplicación de los MIPs como alternativa a los receptores biológicos para la fabricación de sensores podemos destacar su estabilidad operacional en gran variedad de condiciones (temperatura, disolventes, etc.), posibilidad de reconocimiento selectivo en medios orgánicos y acuosos, preparación “a medida” para la especie de interés, facilidad de síntesis, no se requiere el empleo de animales de experimentación y bajo coste. Los sensores basados en MIPs pueden clasificarse en función del elemento de transducción en ópticos,³⁵⁸ electroquímicos³⁹⁶ o piezoeléctricos,³⁹⁷ principalmente. De todos ellos, los sensores ópticos son los que se han estudiado en la presente Tesis Doctoral. En este tipo de dispositivos, la interacción del analito con el receptor genera una señal óptica o un cambio en la misma que se relaciona con la presencia y/o concentración de la especie de interés. Se pueden dividir en sensores

de absorbancia, reflectancia, quimioluminiscencia, fluorescencia e índice de refracción. A continuación, se destacan algunos aspectos relevantes de los sensores basados en absorbancia y en fluorescencia.

La absorbancia es una técnica espectroscópica que mide la cantidad de luz absorbida por una muestra, a una determinada longitud de onda, generalmente comprendida en la región visible y ultravioleta, siendo una de las técnicas más flexibles y utilizadas para la fabricación de sensores. Las medidas realizadas con luz visible son especialmente útiles para determinaciones *in situ*, ya que pueden ser detectadas directamente con el ojo humano.

La fluorescencia consiste en una emisión espontánea de radiación desde una especie electrónica excitada que no está en equilibrio térmico con su entorno. La fluorescencia molecular es la técnica más utilizada para la fabricación de sensores ópticos debido a su elevada sensibilidad, su gran resolución espacial y temporal, el amplio intervalo dinámico de concentración que ofrece y su gran versatilidad. En este tipo de sensores la detección se puede realizar midiendo los cambios que se producen en presencia del analito: incremento de intensidad de fluorescencia (*turn-on*); desactivación de la fluorescencia (*quenching*, *turn-off*) o cambios en el tiempo de vida de luminiscencia, medida que evita problemas derivados de fluctuaciones de la fuente de excitación o de la degradación del fluoróforo. En los sensores fluorescentes basados en MIPs es posible diferenciar tres categorías en función de la naturaleza del analito: analitos fluorescentes que pueden ser monitorizados directamente, analitos no fluorescentes que precisan de competidores fluorescentes para su medida y polímeros marcados con un fluoróforo que modifican su emisión en función en presencia del analito.³⁹⁵

En la Tabla 12 se muestran algunos ejemplos recientes de sensores ópticos basados en MIPs y medidas de absorción y fluorescencia.

5.4.7.6. Pseudo-inmunoensayos

El desarrollo de nanoMIPs, en especial de nanogeles, ha permitido la aplicación de estos materiales en ensayos tipo ELISA. La ventaja de estos materiales es que su tamaño, solubilidad y constantes de afinidad facilita su empleo de manera similar a los anticuerpos para este tipo de ensayos.³⁴³ Por lo general se trata de ensayos competitivos entre el analito

y un análogo marcado con una enzima, *p.e.* peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*), o con un centro metálico que hace las veces de elemento de reconocimiento y señalización. En este tipo de ensayos la placa se tapiza con los nanogeles, de manera similar al protocolo seguido en los ensayos ELISA con los anticuerpos.⁴⁰⁵ Este tipo de ensayos se han aplicado a la determinación por ejemplo, de vancomicina en plasma,⁴⁰⁶ cocaína y derivados en suero sanguíneo,⁴⁰⁷ gentamicina en muestras de leche⁴⁰⁸ o fumonisina B1,⁴⁰⁹ con límites de detección del orden pico y nanomolar. En la Figura 32 se muestra un ejemplo de un ensayo tipo ELISA competitivo entre el analito y su análogo marcado con HRP utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para el revelado de la señal.

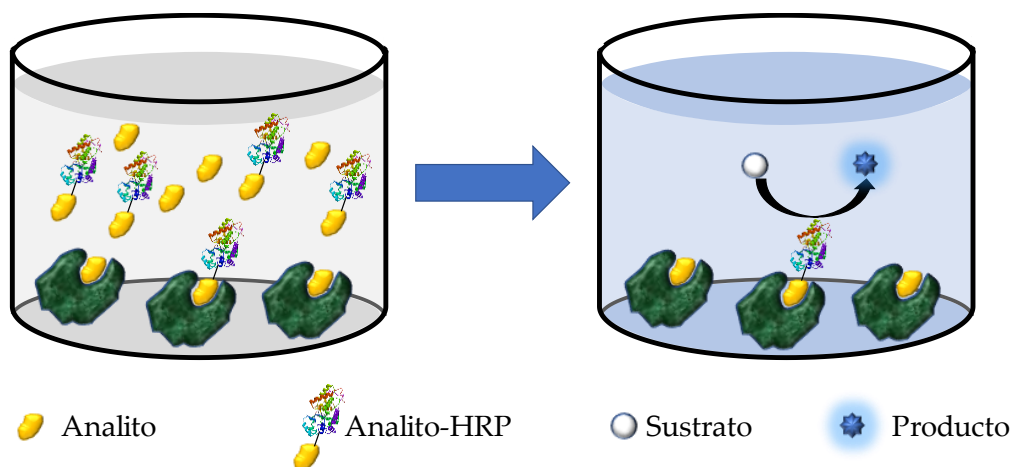


Figura 32. Ejemplo de ensayo competitivo entre una molécula y un análogo marcado con HRP, empleando un pocillo funcionalizado con MIPs.

Tabla 12. Características analíticas de sensores ópticos basados en MIPs.

Analito	Matriz	Tipo de MIP	Principio de medida	Características analíticas	Ref.
Iones Uranilo (UO₂²⁺)	Agua	Nanopartículas en suspensión	Absorbancia Cambio de color	R: 98 – 101 % RD: 0.001 – 1 mg·L ⁻¹ LOD: 0.5 µg·L ⁻¹	398
Enrofloxacinó	Suero animal	Macropartículas en haz de fibra óptica	Fluorescencia Competitivo con análogo marcado	R: n.d. RD: 0.29 – 21.5 µM LOD: 40 nM	358
BR9	Agua	Fibra óptica de poliestireno recubierta de MIP	Absorbancia Aumento de la absorción	R: n.d. RD: 2 – 15 µM LOD: 2 µM	399
JEV	Suero	MIP@SiO ₂ -PC	Fluorescencia – FRET Incremento de intensidad	R: 98 – 100 % RD: 24 – 960 pM LOD: 9.6 pM	400
TNT, 2,6-DNT, 2,4-DNT y 4-MNT	n.d.	Matriz de MIPC	Absorbancia Difracción – Cambio de color	R: n.d. RD: n.d. LOD: 2.14 – 4.85 µg	401
Cocaína	Orina y saliva	MIP@QDs	Fluorescencia Desactivación	R: 97 – 109 % RD: n.d. LOD: 15 – 35 µg·L ⁻¹	402
Neomicina	Muestras biológicas	MIP@QDs@SiO ₂	Fluorescencia Desactivación	R: 91 – 111 % RD: 2 – 1000 µg·L ⁻¹ LOD: 0.7 µg·L ⁻¹	403
τ-fluvalinato	Vodka	MIP-dye@SiO ₂	Fluorescencia Desactivación	R: 104 – 111 % RD: 0 – 150 nM LOD: 13.2 nM	404

n.d.: no descrito; R: Recuperación; DR: Intervalo dinámico; LOD: límite de detección; BR9: tinte rojo básico 9; JEV: virus de la encefalitis japonesa; SiO₂: sílice; PC: 1-prienobarboxialdehído; MIPC: Cristal fotónico de impronta molecular; QDs: puntos cuánticos; FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster; TNT: trinitrotolueno; 2,6-DNT: 2,6-dinitrotolueno; 2,4-DNT: 2,4-dinitrotolueno; 4-MNT: 4-mononitrotolueno.

AIM OF RESEARCH

The aim of this Thesis work is the synthesis, characterization and application of new selective polymeric materials, mainly molecularly imprinted polymers (MIPs), in the development of analytical methods for food safety and quality control.

Several areas of application of the polymeric materials in food chemistry have been explored, including the development of optical sensors, the synthesis of selective sorbents for use as solid phase extraction cartridges in analytical separations or the production of food packaging materials with controlled release properties. The majority of the materials explored in this work are based on MIPs, which are considered as synthetic antibody mimics that selectively recognize molecular targets. MIPs are highly robust, showing excellent operational stability under a wide variety of conditions. They can be used in organic or in aqueous media and their cost is lower and their preparation is easier than that of antibodies, avoiding the use of laboratory animals or the difficulties associated to the production of antibodies for toxic compounds.

The targets of this study include, furfural, a sensitive indicator of beer staling that had not been analyzed previously using chemical sensors, of great interest for the brewery industry to control the quality of beer. Alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid, three natural mycotoxins produced by *Alternaria* fungi, for which there are currently no guideline limits set by regulatory authorities in foodstuffs, but are under evaluation by the European Commission to set maximum levels. Therefore sensitive, selective and robust methods must be implemented for their analysis in complex food matrices. Finally, in a different approach, the application of ferulic acid, a natural antioxidant obtained as a by-product during beer production, has also been investigated in combination with MIPs, an application still in its infancy in combination with these selective recognition materials.

The individual objectives of this study are summarized below:

1. Development of molecularly imprinted hydrogels (MIHs) selective to ferulic acid (FA) for the fabrication of active antioxidant packages to extend the shelf life of butter.

2. Development of disposable color-changing polymeric films for the quantification of furfural as a freshness indicator in beer using a smartphone-based reader.
3. Development of molecularly imprinted microbeads selective to alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME) to determine their presence in food products by UPLC-MS/MS.
4. Development of a method for the determination of AOH and AME in tomato samples based on pressurized liquid extraction (PLE) combined with molecularly imprinted solid extraction (MISPE) and HPLC-FLD analysis.
5. Development of a luminescent Eu(III) doped MIP-based sensor for the determination of tenuazonic acid (TeA).

PUBLICACIONES

CIENTÍFICAS

7.1. Molecularly imprinted hydrogels as functional active packaging materials

En el primer trabajo de esta Tesis Doctoral se describe la preparación de MIPs en formato de hidrogel para la liberación controlada de ácido ferúlico, un antioxidante natural, y su aplicación como materiales inteligentes de envasado para prevenir la oxidación lipídica en mantequillas.

Con este fin se llevó a cabo la síntesis de una molécula plantilla análoga al ácido ferúlico para llevar a cabo la síntesis del MIP, concretamente el ácido hidroferúlico, que no interviene en el proceso de polimerización radicalaria al carecer de dobles enlaces. A continuación, y con el objetivo de buscar el material que ofreciera mejores características para su empleo como material de envasado, se sintetizó una librería de MIPs y NIPs utilizando diversos monómeros funcionales. Seguidamente se evaluaron diferentes parámetros físicos y estructurales de los MIPs sintetizados, tales como la velocidad de hinchamiento, la capacidad de carga y el factor de impronta frente al ácido ferúlico. Asimismo, se realizó su caracterización química determinando las isothermas de adsorción de los MIPs/NIPs frente al ácido ferúlico que permitió evaluar el número de sitios de unión y las constantes de afinidad frente al analito de los diferentes polímeros sintetizados. A partir de estos estudios se seleccionó el MIP óptimo para su empleo como material de envasado inteligente para la liberación controlada de ácido ferúlico en mantequillas. Finalmente, se realizaron ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana de los hidrogeles cargados con el antioxidante frente a dos tipos de bacterias, *E. Coli* y *S. Aureus*, que pueden encontrarse en alimentos.

Las etapas de las que consta este trabajo se pueden resumir en:

1. Hidrogenación del ácido ferúlico para la obtención de una molécula plantilla para la síntesis de los MIPs.
2. Síntesis de una librería de MIPs y NIPs empleando diferentes monómeros funcionales.
3. Caracterización física y estructural de los hidrogeles sintetizados.
4. Evaluación de la capacidad de carga y el factor de impronta de los MIPs y NIPs.

5. Caracterización de los sitios de unión y determinación de las isothermas de adsorción.
6. Evaluación de la efectividad antimicrobiana y de la efectividad antioxidante de los hidrogeles sintetizados en muestras de mantequilla.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

Molecularly imprinted hydrogels as functional active packaging materials



Elena Benito-Peña^a, Victoria González-Vallejo^a, Alberto Rico-Yuste^a, Letricia Barbosa-Pereira^b, José Manuel Cruz^b, Ainhoa Bilbao^c, Carmen Alvarez-Lorenzo^{d,*}, María Cruz Moreno-Bondi^{a,*}

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense, s/n, Madrid 28040, Spain

^bDepartment of Chemical Engineering, School of Industrial Engineering, University of Vigo, Campus As Lagoas, Marcosende, 36310 Vigo, Spain

^cBiotechnology Division, GAIKER-IK4 Technology Centre, Ed. 202, 48170 Zamudio, Spain

^dDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Reproduced from:

Food Chemistry 2016, **190**, 487–494

Copyright © 2016, with permission from Elsevier

Abstract

This paper describes the synthesis of novel molecularly imprinted hydrogels (MIHs) for the natural antioxidant ferulic acid (FA), and their application as packaging materials to prevent lipid oxidation of butter. A library of MIHs was synthesized using a synthetic surrogate of FA, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HFA), as template molecule, ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker, and 1-allylpiperazine (1-ALPP) or 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA), in combination with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as functional monomers, at different molar concentrations. The DMAEMA/HEMA-based MIHs showed the greatest FA loading capacity, while the 1-ALLP/HEMA-based polymers exhibited the highest imprinting effect. During cold storage, FA-loaded MIHs protected butter from oxidation and led to TBARs values that were approximately half those of butter stored without protection and 25% less than those recorded for butter covered with hydrogels without FA, potentially extending the shelf life of butter. Active packaging is a new field of application for MIHs with great potential in the food industry.

7.1.1 Introduction

Lipid oxidation, together with microbial spoilage and browning reactions, is a major cause of food deterioration and a great challenge for food manufacturers. Lipid oxidation is a relevant quality problem in the processing, packaging and storage of foodstuffs with high fat content. Spontaneous reaction of lipids with atmospheric oxygen (autooxidation) is the main process involved in degradation of dietary lipids. It proceeds via a series of free-radical chain reactions that can result in the development of off-flavors and odors, changes in color and texture, destruction of valuable nutrients, or even generation of toxic compounds.¹ Therefore, lipid oxidation is a decisive factor in determining shelf life, especially for foods with high fat content, such as butter.^{2,3}

The food industry applies several methods to prevent oxidation reactions. Vacuum or inert atmosphere packaging, using materials with adequate barrier properties against gas or radiation, and incorporation of antioxidants are the most popular.⁴ However, this is a challenging issue for many foodstuffs. For example, the use of vacuum or inert atmospheres in fresh meat packaging may favor the development of pathologic anaerobic microorganisms, or changes in pigmentation, which have a negative impact on product quality and safety. The efficiency of inert atmospheres also decreases when the packaging is opened and stored on several occasions.

The use of antioxidants may overcome some of these shortcomings. These compounds interact with reactive oxygen species, protecting lipids from oxidation,⁵ and retain flavor, color and freshness for extended periods of time. Currently, there is a trend for incorporating antioxidants in the packaging material with a dual purpose; packaging and protecting foods through controlled release of the antioxidant. Special interest is being focused on the development of active materials incorporating antioxidants for such application, with emphasis on those of natural origin, such as tocopherol, oregano or rosemary extracts,⁶⁻¹² due to concerns raised about the safety of synthetic antioxidants.¹³

Ferulic acid (FA) is a phenolic member of the cinnamic acid family, commonly found in seeds, leaves, both in free form and covalently conjugated to the plant cell wall polysaccharides, glycoproteins, polyamines, lignin and hydroxy fatty acids.¹⁴ It is well

known for its high antioxidant capacity, similar to that of superoxide dismutase, one of the most potent antioxidants.¹⁵ Although rarely found in free form, the ester form of FA is attached to polysaccharides such as arabinoxylans, pectins and xyloglucans, and proteins.¹⁶ Thanks to its low toxicity, FA is used in the food industry as a preservative and cross-linker for the preparation of gels and edible films.¹⁷ Compared to other antioxidant phenolic compounds, FA shows a higher antioxidant activity, with a lower dependence on pH, and it can also inhibit the growth of bacteria, fungi and yeasts.¹⁸

Molecular imprinting allows the preparation of synthetic materials, which can be processed in a variety of formats and with tunable sorption/release behavior, with the ability to recognize specific molecules for a variety of applications.¹⁹ The advantage of MIPs as active-molecule delivery systems is that they can regulate the release rate according to an affinity-based mechanism, increasing the residence time of the target molecule within the polymer matrix by means of either covalent or non-covalent bonding in specific binding sites. The creation in the polymer network of ad hoc binding sites for a specific molecule also leads to enhanced loading efficiency and enables more precise control of the performance of the network when the release is intended to be triggered by specific stimuli, such as the concentration of a given substance or a change in a physical variable.²⁰ The interest in MIPs relies on their low cost, the ease of synthesis, and their relatively high stability against temperature, pressure, organic solvents, and acid and alkaline conditions. However, to the best of our knowledge, MIPs have not yet been evaluated as components of active substance-eluting food packages.

In this work we describe the application of molecularly imprinted hydrogels (MIHs), loaded with FA, as active antioxidant films for the packaging of oxygen-sensitive foods. The release of FA into food does not result in a toxicological risk, which is an advantage over the use of synthetic antioxidants. The surrogate template approach has been applied to prevent co-polymerization of FA during MIHs synthesis. To do that, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HFA) was synthesized and used as template for the preparation of MIHs using the con-covalent imprinting approach. Two functional monomers, namely 1-allylpiperazine (1-ALPP) and 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA), in combination with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as co-monomer and ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker, at different

molar concentrations, have been evaluated for MIH synthesis (Figure 7, Supplementary Material, 7.1.5.3). The HFA-imprinted hydrogels were characterized by IR and equilibrium rebinding assays, determining their cross-reactivity to FA by HPLC with diode array detection (HPLC-DAD). The MIHs compositions providing higher FA loading capacities and lower non-selective bindings, when compared to the respective non-imprinted hydrogels (NIHs), were further characterized monitoring their antioxidant and antibacterial properties. The effectiveness of the new antioxidant active packaging FA-MIH to retard lipid oxidation was tested in butter samples.

7.1.2. Experimental

7.1.2.1 Materials

All solvents were chromatographic grade and used without further purification. Pure water from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, USA) was used. Ferulic acid (FA, 99%), 1-allylpiperazine (1-ALPP, 96%), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA, 97%), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA, 98%), 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA, 99%), dimethyldichlorosilane (99.0%), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, $\geq 99.5\%$) and 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES, $\geq 99.5\%$) were all from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Trifluoroacetic acid (TFA, peptide grade, $>99\%$) was from Fluorochem (Hadfield, UK). Trichloroacetic acid PA-ACS (TCA, 99.5%) and trichloromethane stabilized with 50 ppm of amylene PA-ACS (99.8%) were provided by Panreac Química S.L.U. (Barcelona, Spain). 2-Thiobarbituric acid (TBA, $\geq 98\%$) and 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP, $\geq 96\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

The chromatographic system consisted of a HP-1100 series high performance liquid chromatograph from Agilent Technologies (Palo Alto, USA) equipped with a quaternary pump, on-line degasser, autosampler, automatic injector, column thermostat and diode-array (DAD) detector. Chromatographic separation of FA and HFA was performed on an AQUA™ C18 analytical column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) from Phenomenex (Torrance, USA). An isocratic program was used with the mobile phase combining 60% of solvent A (H₂O with 0.3% TFA) and 40% of solvent B (acetonitrile,

ACN, with 0.3% TFA) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The absorbance wavelength was set at 320 nm.

7.1.2.2. Synthesis of hydroferulic acid (HFA)

A solution of 0.5 g of FA in 50 mL absolute methanol (MeOH) was circulated through the H-CubeTM hydrogenator (Thalesnano Nanotechnology Inc.) through a 10% Pd/C catalyst (Figure 1). The flow rate was set at 1 mL min⁻¹ and the temperature at 25 °C (full hydrogen mode). The process was repeated three times to obtain HFA with purity over 95%. Product formation was confirmed by FTIR-ATR spectrometry (Perkin Elmer, UK) and ¹H NMR analysis (Bruker Avance DPX 300 MHz-BACS60). The peaks of HFA in CDCl₃ were assigned as follows: δ (ppm): 6.84 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.71-6.69 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.90 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.65 (t, J = 7.7 Hz, 2H) (Figure 6, Supplementary Material, 7.1.5.2.).

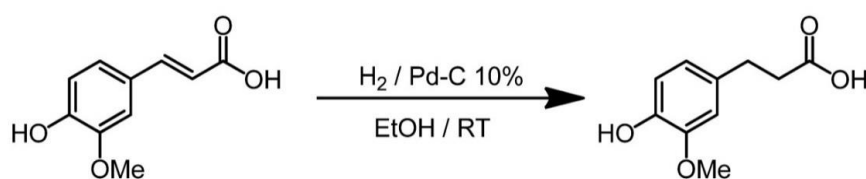


Figure 1. Reaction scheme for HFA synthesis from FA.

7.1.2.3. Synthesis of imprinted (MIH) and non-imprinted (NIH) hydrogels

The HFA imprinted and non-imprinted hydrogels were prepared following a previously reported procedure.²¹ The composition of the MIH and NIH libraries is shown in Table 2 (Supplementary Material, section 7.1.5.1.). In a typical procedure, the prepolymerization mixture was purged with a stream of Ar for 10 min and injected into the polymerization molds formed by two glass plates (10 x 10 cm), previously treated with dimethyldichlorosilane, held together and separated by a 0.9 mm thick silicone spacer (1 cm wide).²² The molds were placed in an oven at 50 °C for 12 h and then at 70 °C for 24 h. After polymerization the imprinted and non-imprinted membranes were removed from the molds and immersed into boiling water for 15 min, to extract the unreacted components. Finally, the membranes were cut into 10-mm diameter discs and subsequently rinsed with EtOH 96% until removal of the template was >99.9%, as

checked by HPLC-DAD. Finally, the discs were dried in a vacuum oven at 45 °C for 48 h and stored in the dark at room temperature.

7.1.2.4. Physical and structural characterization of MIHs/NIHs

IR spectra were recorded using a FTIR-ATR (Perkin Elmer, UK) in the wave-number range of 400-4000 cm⁻¹. DSC scans of dried hydrogels (5-10 mg) were carried out in a DSC Q100 (TA Instruments, New Castle, USA) with a refrigerated cooling accessory. The samples were heated from 25 up to 150 °C, cooled down to -10 °C, and then heated again to 300 °C, always at 10 °C min⁻¹. Nitrogen was used as purge gas at a flow rate of 50 mL min⁻¹. All experiments were performed in duplicate. Degree of swelling in water was calculated, in triplicate, as follows (Eq. 1):

$$Q(\%) = \frac{w_t - w_0}{w_0} \cdot 100 \quad (1)$$

where w_0 is the weight of the dry hydrogel sample, and w_t is the weight of the hydrogel after being immersed in water for a time t . Oxygen permeability (D_k) and transmissibility of hydrogels previously swollen in a 0.9% NaCl solution were measured in triplicate at room temperature using a Createch permeometer (model 210T, Rehder Development Company, Castro Valley, USA) fitted with a flat polarography cell and in a chamber at 100% of relative humidity.

7.1.2.5. FA loading and sorption kinetics

To evaluate the loading capacity in different solvents, dry hydrogels (approximately 90 mg) were immersed in 5 mL of FA 68 μM solutions prepared in HEPES 0.1 M (pH 7.5), HEPES 0.1 M (pH 7.5)/ACN (75/25; v/v), MES 0.1 M (pH 5.7) or distilled water and incubated in a shaker, at 150 rpm, for 48 h at 25 °C. After incubation, the supernatant was collected and injected into the HPLC-DAD instrument. For equilibrium binding experiments, the polymers were incubated with FA in a concentration range between 50 – 4000 μM in water. After 48 h, the hydrogels were removed and the concentration of FA in the supernatant was monitored by HPLC-DAD. The amount of FA bound to the polymer was calculated as μg of FA g⁻¹ of dry hydrogel. The experimental data were fitted to a Freundlich isotherm (FI) model.²³ All experiments were carried out in triplicate.

7.1.2.6. Antimicrobial activity of the FA-loaded MIHs

Antimicrobial activity of MIHs with and without FA were assessed against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, and total aerobic mesophilic flora isolated from chicken roti. The evaluation of MIHs with T2 formulation was performed using qualitative (agar diffusion) and quantitative (ASTM E 2149) methods, as described in Supporting Information (section 7.1.5.6.).

7.1.2.7. Antioxidant effectiveness of FA-loaded MIHs as butter packaging

Pieces (10 cm) of FA-loaded MIHs and non-loaded NIHs (used as controls) were placed on the top surface of butter in cans containing 250 g butter, kindly supplied by Feiraco (Ames, Spain). Butter cans, prepared under the same conditions, without placing film on the surface of the butter were used as another control. The cans were covered with a plastic tape (with a gap to the surface of either the butter or the covering film of 1-2 cm, which imitates common use conditions) and stored at 4 °C during six weeks. Butter samples were collected at selected times for analysis. Three different trials were performed to evaluate the effectiveness of the FA-loaded MIHs in reducing lipid oxidation and the influence of the waiting time between subsequent sample collections on butter oxidation. Sampling was carried out every two days in the first trial (0, 2, 4, 7, 9, 11 and 14 days), every week in the second trial (0, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 weeks), and after three weeks in the third trial (0 and 3 weeks). At each time of sampling, the films were removed from the surface and 3.0 ± 0.1 g of butter collected in a screw-capped test tube. Since the diameter of the butter cans was 10 cm, the amount (3 g) of butter collected represents the removal of a maximum depth of one millimeter. After sampling, the FA-loaded MIH and the non-loaded NIH films were placed back on top of the butter until the next measurement.

Lipid oxidation was evaluated applying the 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) method slightly modified.²⁴ Butter was melted at 70 °C for 10 min and filtered under vacuum before use. An aliquot of filtered butter (0.3 ± 0.05 g) was weighed in a screw-capped test tube and extracted with 5 mL of 10 % TCA solution. Samples were vigorously shaken in a vortex. After that, 3 mL of an aqueous TBA solution (0.5 %) were added to the test tube, which was sealed with a screw cap,

homogenized using a vortex shaker and incubated in an oven at 100 °C for 40 min. Then, the samples were cooled to room temperature and the fat was removed by shaking with 3 mL of chloroform followed by centrifugation. Finally, the absorbance was measured at 530 nm against a blank containing 5 mL of TCA solution and 3 mL of TBA reagent. All the analysis were performed in triplicate. The concentration of malondialdehyde (MDA), a relatively stable end product generated during secondary lipid oxidation, was calculated from a standard curve obtained using 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), a precursor of MDA, at concentrations between 0 and 2 mg L⁻¹. Results were expressed as milligrams of MDA per kilogram of butter.

Lipid oxidation data were compared using analysis of variance (ANOVA) and significant differences between the butter cans packaging conditions (control, NIHs and MIHs) were assessed by the Duncan's multiple range test at $P < 0.05$ using the IBM SPSS Statistics 20.0.0 software package. TBARs data are presented as the mean and the standard deviation.

7.1.3. Results and Discussion

7.1.3.1. MIHs preparation

All polymers were prepared with HEMA as functional co-monomer in order to obtain safe, non-toxic, hydrophilic networks that when in contact with food release the active compound. The monomers HEMA and DMAEMA and the cross-linker EDMA are authorized for the manufacture of plastic materials intended to come into contact with foodstuff according to the EU legislation.²⁵ This is not the case for 1-ALLP; however, this functional monomer was tested as well because it is able to interact through hydrogen bonding with the template molecule. It should be noted that preliminary studies of migration of residual monomers from the hydrogel films led to values below the limits established for food contact materials.²⁶

The use of FA as a template for polymer preparation was discarded as this molecule contains a reactive double bond in position 2 that may lead to the incorporation of FA into the polymer network, blocking the binding sites in the resulting material. To overcome this shortcoming and produce high quality binding sites, FA was

hydrogenated and the resulting hydrofeluric acid (HFA) was used instead as template for MIHs synthesis (Figure 1; ^1H NMR in Figure 6, section 7.1.5.2.). As shown in Figure 7 in the Supplementary Material (section 7.1.5.3), hydrogen bonding interaction of the HFA template with the functional monomers 1-ALPP and DMAEMA was confirmed by ^1H NMR. No signal shifts were observed in the ^1H NMR spectra of HFA upon addition of HEMA, the structural monomer added to the polymerization mixture to endow the polymeric film with hydrophilicity.

For polymer preparation, HFA was directly dissolved in the monomers mixture. The composition of the MIH and NIH libraries is shown in Table 2 (section 7.1.5.1.). The resulting MIHs were translucent in the dry form, but transparent when hydrated, irrespective of their composition. DSC scans of the dry MIHs and NIHs (data not shown) were very similar. The dried networks exhibited just one glass transition at 92-93 °C, which is slightly below that recorded for pHEMA networks. These results confirm the good miscibility of the monomers used for MIH synthesis (namely, random polymerization occurred) and that the presence of HFA during polymerization did not affect the stiffness of the network.

7.1.3.2. Swelling kinetics

The swelling profiles of the MIHs and NIHs in water are shown in Figure 2. The MIHs swelled faster and to a larger extent than the NIHs for all the compositions tested, except for the 1-ALLP/HEMA polymers. This behavior has been attributed to the higher porosity of the imprinted networks as a result of the different propagation rate of the radical polymerization reaction in the presence of the template.²⁷ MIHs containing exclusively HEMA as functional monomer (Ai) showed greatest swelling. In contrast, all NIHs showed similar swelling profiles regardless of the comonomer used.

Water diffusion coefficients D_w were calculated by fitting the following solution of Fick's law to the relative degree of swelling (Eq. 2):²¹

$$\frac{W_t}{W_\infty} = 4 \left(\frac{D_w t}{\pi h^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

where t is the swelling time, W_t is the weight of the sample after t min of incubation; W_∞ is the final weight of the sample and h is the average thickness of the hydrogel.

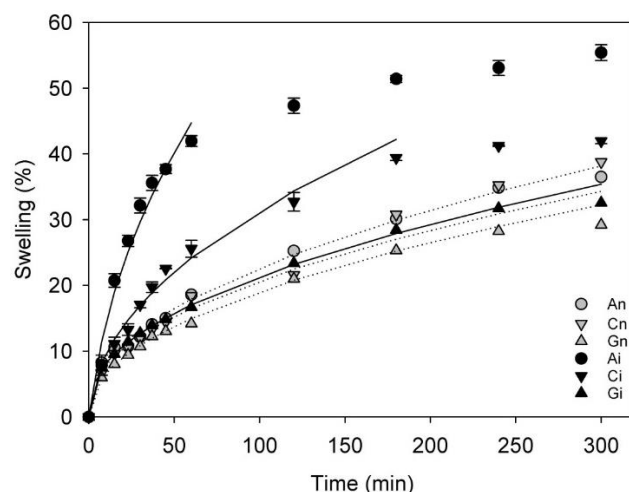


Figure 2. Swelling profiles of the NIHS and MIHS synthesized with HEMA (An and Ai), DMAEMA/HEMA (Cn and Ci) and 1-ALPP /HEMA (Gn and Gi) as functional monomers ($n=3$). Lines show the fitting to Equation 2 (continuous lines refer to MIHS, and dotted lines to NIHS).

Water uptake showed a linear dependency on $t^{1/2}$ ($r^2 > 0.98$) for all the polymers tested. Therefore, a Fickian behavior is observed in spite of polymer swelling, i.e., water molecules easily penetrate into the free pore volume and polymer relaxation does not influence the sorption rate, as previously reported for other HEMA hydrogels.²⁸ Water diffusion coefficients in the MIHS were (Ai: $3.66 \pm 0.02 \times 10^{-6}$, (Ci: $1.97 \pm 0.01 \times 10^{-6}$, and (Gi: $0.94 \pm 0.01 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. While the corresponding values in the NIHS were $(0.99 \pm 0.01) \times 10^{-6}$, $(0.68 \pm 0.01) \times 10^{-6}$ and $(1.13 \pm 0.01) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, for An, Cn and Gn, respectively. These values are similar to those reported previously for HEMA-solely hydrogels in water,²⁹ but smaller than the self-diffusion coefficient of water, $2.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. This finding suggests that the diameter of the hydrogel capillaries are not much larger than the water molecule diameter.³⁰

7.1.3.3. FA loading capacity and imprinting factor

FA rebinding assays of MIH/NIHS synthesized either with HEMA (A) or with mixtures of HEMA and DMAEMA (C) or 1-ALPP (G) (template:functional monomer 1:2 molar ratio) were carried in water and in saline media. The polymers (90 mg) were incubated in 5 mL of a 0.068 mM FA for 48 h, which was sufficient for the networks to reach the binding equilibrium (see Figure 8, section 7.1.5.4). The highest FA uptake, both in water and HEPES buffer, was observed with the P(DMAEMA-*co*-HEMA-*co*-EDMA)

hydrogels, while rebinding in the P(1-ALPP-*co*-HEMA-*co*-EDMA) networks was less, especially in the buffered media (Figure 3).

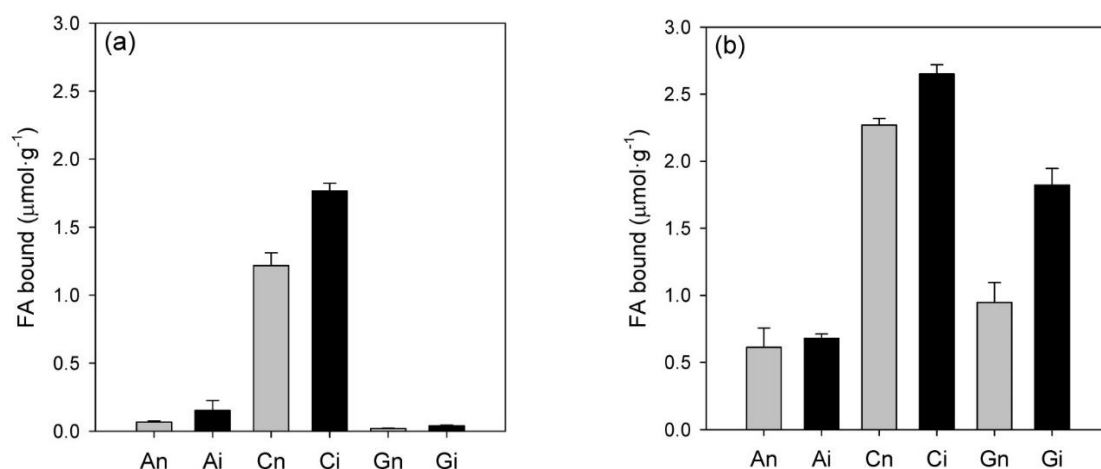


Figure 3. FA rebinding in the MIHs (black squares) and NIHs (grey squares) after 48 h incubation in (a) HEPES (0.1 M, pH 7.5) and (b) water. (n = 3, RSD < 12%). Hydrogel codes as in Table 2 (section 7.1.5.1).

The higher retention of FA in these networks in comparison to the P(HEMA-*co*-EDMA) polymers can be explained considering the ionic interaction of the antioxidant with the positively charged DMAEMA (pK_a 8.4)³¹ or 1-ALPP (pK_a 9.2)³² monomers in the binding cavities at the sample pH. The presence of salts in the buffer decreased FA rebinding in all the polymers, which could be attributed to the screening of the ionic interactions at the binding sites as a result of the high ionic strength.

Increasing the template: functional monomer molar ratio from 1:2 to 1:4, in both the 1-ALPP/HEMA (Ii) and DMAEMA/HEMA (Mi) MIHs, resulted in a 2- to 3-fold increase in the uptake of FA by the MIHs. (Figure 4 a and b) The amount of FA rebound to the hydrogels was always lower for the MIHs prepared with 1-ALLP than for those with DMAEMA; however, the former showed a higher imprinting effect in water. A comparison of the elemental analysis data shown in Table 3 (Supplementary Material, section 7.1.5.1.) revealed a lower incorporation of 1-ALLP monomer, compared to DMAEMA, in the cross-linked network that could explain the decreased FA binding. The lowest FA loading capacity was observed with the 1-ALPP/HEMA NIHs, meaning that the network itself has a lower affinity for the antioxidant. In other words, the interaction of FA with randomly distributed 1-ALLP is weaker than with DMAEMA. Higher imprinting factors (IF) were also recorded for 1-ALLP-bearing MIHs (Ri vs. Rn; Figure 4c), compared to DMAEMA-containing MIHs (Ti vs. Tn; Figure 4d), when the

concentration of both the template and the functional monomer raised while keeping 1:2 molar ratio. Thus, the beneficial effects of the template polymerization became more evident for 1-ALLP-bearing polymers; i.e., the creation of imprinted cavities led to a marked increase in binding capacity. This finding is in agreement with previous reports that prove that higher imprinting factors are obtained using functional monomers with low-to-mid affinity for the template, which minimizes nonspecific interactions in the non-imprinted network.^{33,34}

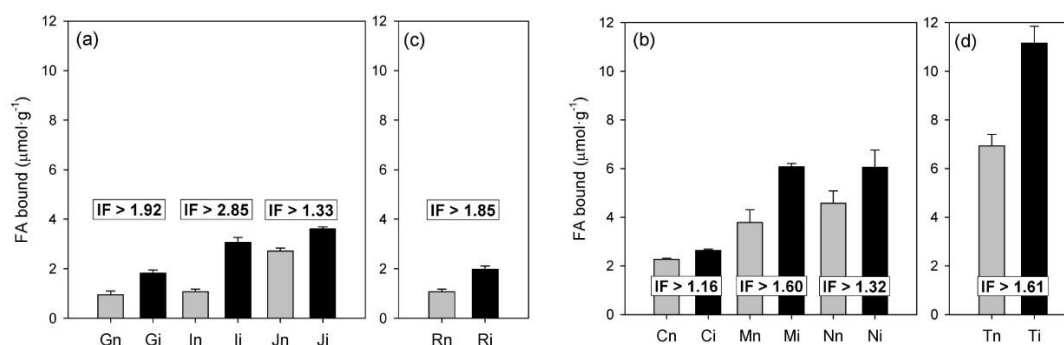


Figure 4. Amount of FA rebound after 48h incubation in 5 mL of 0.068 mM FA in water: (a) 1-ALPP/HEMA hydrogels and (b) DMAEMA/HEMA hydrogels ($n = 3$, $RSD < 9\%$). MIJs (black squares) and NIJs (grey squares). Hydrogel codes as in Table 2 (section 7.1.5.1).

An excess of functional monomer (1:8 molar ratio) did not increase further the loading capacity of the hydrogels, but even diminished the differences between imprinted and non-imprinted networks bearing 1-ALLP (Ji and Jn; Figure 4a) or DMAEMA (Ni and Nn; Figure 4b). This means that for MIJs prepared using 1:8 molar ratio most functional monomers are randomly distributed as in the case of the NIJs.³⁵

7.1.3.4. FA sorption isotherms

The binding properties and homogeneity of the binding sites in the P(DMAEMA-*co*-HEMA-*co*-EDMA) and the P(1-ALLP-*co*-HEMA-*co*-EDMA) polymers were assessed in equilibrium binding experiments, using FA aqueous solutions in the 50-4000 μM range (Figure 9, section 7.1.5.5.). Once again the higher loading capability of DMAEMA-bearing networks was evidenced.

The adsorption isotherms were fitted to the Freundlich model (Eq. 3):

$$\log B = m \cdot \log F + \log a \quad (3)$$

where B ($\mu\text{mol g}^{-1}$) and F (μM) are the concentrations of bound and free FA, respectively, and a and m are fitting constants that yield a measurement of physical binding parameters.^{23,36} The preexponential factor a is a measure of the capacity (number of binding sites) and average affinity of the network. The constant m is a heterogeneity index; m values close to 1 indicate that all binding sites are identical from an energetic point of view, while m values near 0 indicate heterogeneous binding points.³⁶

The fitting data are summarized in Table 4 (Supplementary Material, section 7.1.5.5.). Comparison of the heterogeneity parameter in the FI isotherm reveals a slightly higher heterogeneity for the MIHs than for the NIHs, which confirms that the presence of template during the polymerization contributes to the heterogeneity of the material, increasing the affinity of the binding sites by causing an adequate spatial arrangement of the monomers.

The affinity distribution of the binding sites (i.e., the plot of the number of sites N that have association constant K) was estimated using the following equation:³⁶

$$N(K) = 2.303 \cdot a \cdot m \cdot (1 - m^2) \cdot e^{-2.303 \cdot m \cdot \log K} \quad (4)$$

within the limits $K_{\min} = 1/F_{\max}$ and $K_{\max} = 1/F_{\min}$. The affinity distributions showed the exponential decay that is characteristic of the isotherm region far from saturation.²³ In the subsaturation region (low loadings), the differences between imprinted and non-imprinted networks became particularly evident. As expected from the m values, the affinity distributions shown in Figure 10 (section 7.1.5.5.) indicate that the networks have association constants ranging from 290 to 80,000 L mol^{-1} , with predominance, in all polymers, of sites with low affinity. NIH In prepared with 1-ALPP functional monomer had the lowest number of binding points and with the lowest affinity. The corresponding MIH Ii showed a markedly greater number of binding sites and also with higher affinity. On the other hand, the networks prepared with DMAEMA as functional monomer (T1 and T2) possessed many more binding sites of high association constant. In this latter case, the contribution of the imprinting was smaller as DMAEMA can provide high affinity binding points even when polymerized in the absence of the template.

7.1.3.5. Antimicrobial activity of FA-loaded MIHs

MIHs did not cause growth inhibition against the tested bacteria neither in agar plates Figure 11 (Supplementary Material, section 7.1.5.6.) nor in cell suspensions, which means that the amount of FA released was well below the minimal inhibitory concentration. In fact, bactericidal effect of FA was only observed for large concentrations ($\sim 3 \text{ mg ml}^{-1} = 15,400 \text{ }\mu\text{M}$). Nevertheless, bacterial growth was not observed below the polymer (MIH/NIH) discs placed in direct contact with the bacterial culture surface. This finding can be attributed to a decrease in the oxygen concentration below the disc, which inhibits the growth of common food microbial contaminants *E. coli* and *S. aureus*. Thus, MIHs could contribute to food packaging materials not only with FA antioxidant performance, but also acting as a physical barrier for bacteria growth.

7.1.3.6. Antioxidant properties of FA-loaded MIHs in real samples (butter cans)

Several studies carried out in parallel during the present work confirmed that the FA-loaded MIHs²⁶ comply with food contact materials legislation established by Commission Regulation (EU) No. 10/2011.²⁵

Then, FA-loaded MIHs were tested for their suitability as antioxidant active packaging materials able to inhibit lipid oxidation of butter during storage. Antioxidant effectiveness was determined using the TBARs method, and the results are expressed as TBARs (mg MDA Kg^{-1} of sample) (Table 1). The TBARs values were calculated for butter cans covered with the MIHs (Ti) loaded with FA and compared with those recorded for butter cans covered with the NIHs (Tn) without FA (for assessment of the effect of the polymer film itself without FA) and with those obtained for butter cans packaged in the absence of any film (controls opened to air).

The results show that the oxidation of the butter covered by the FA-loaded Ti MIH was, in most cases, significantly less intense than that recorded for butter covered with the film without FA (Tn) or for the control (without film). The greatest differences were observed in the first trial (sampling every two days) (Table 1a).

Table 1. TBARs values (mg MDA Kg⁻¹ of sample) obtained in butter samples from cans without film (control) or covered with control film Tn (NIH) or with FA-loaded film Ti (MIH), determined in different sampling trials (a) every two days; (b) every week; (c) after three weeks, during storage at 4 °C. Mean values and, in parenthesis, standard deviations*

Sample	(a) Time storage (days)						
	0	2	4	7	9	11	14
Control	0.75 (0.02)	0.98 (0.01) ^a	1.03 (0.00) ^a	1.03 (0.02) ^a	0.75 (0.03) ^a	0.72 (0.09) ^a	0.67 (0.06) ^a
Tn	0.75 (0.02)	0.77 (0.02) ^b	0.75 (0.07) ^b	0.52 (0.07) ^b	0.50 (0.06) ^b	0.54 (0.08) ^b	0.60 (0.09) ^a
Ti	0.75 (0.02)	0.58 (0.02) ^c	0.58 (0.00) ^c	0.41 (0.02) ^c	0.35 (0.03) ^c	0.43 (0.06) ^b	0.49 (0.15) ^a
	(b) Time storage (weeks)						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	0.94 (0.12)	1.22 (0.01) ^a	0.80 (0.15)	0.92 (0.14)	0.93(0.03) ^a	1.08 (0.20) ^a	0.83 (0.04) ^a
Tn	0.94 (0.12)	1.24 (0.04) ^a	0.90 (0.19)	0.88 (0.03)	0.66 (0.08) ^b	0.75 (0.09) ^b	0.72 (0.02) ^b
Ti	0.94 (0.12)	0.90 (0.06) ^b	0.77 (0.11)	0.88 (0.08)	0.62 (0.06) ^b	0.54 (0.00) ^b	0.54 (0.03) ^c
	(c) Time storage (weeks)						
	0	3					
Control	0.70 (0.05)	1.46 (0.15) ^a					
Tn	0.70 (0.05)	1.42 (0.23) ^a					
Ti	0.70 (0.05)	0.53 (0.09) ^b					

*Different lower case superscript letters (within the same time/column) denote significant differences between the mean values (n=3) at P < 0.05.

During the first 11 days of storage at 4 °C, the lipid oxidation values obtained in the presence of the active films (Ti) were reduced around 40-60 % with respect to the control without film and 20-25 % with respect to the film control (NIH Tn). These differences may be attributed to the presence of oxygen that comes into contact with the butter whenever the can is opened. The headspace of the container is filled with air, leading to an increment in the oxidation process. These results are in agreement with those reported by Mallia et al.³ showing that the oxidation of conventional butter during storage, in the presence of oxygen, involves the conversion of unsaturated fatty acids to hydroperoxides, which decompose into secondary oxidation products. Films without FA in contact with the butter surface reduced lipid oxidation as a result of the protection against the oxygen present in the headspace of the container, when compared with the control without film.

In the second trial (weekly sampling), the differences between cans covered with MIH or NIH were less significant in the first weeks of storage, but after four weeks MIHs were more efficient in preventing butter oxidation (33-50% lower oxidation compared to uncovered cans). After 6 weeks storage, butter samples covered with FA-loaded MIHs presented lower TBARs values than those covered with non-loaded NIHs, and the corresponding controls without film (Table 1b).

In the third trial (sampling after three weeks), because the butter surface was exposed to oxygen for a more prolonged time than in previous trials, oxidation recorded for MIHs were 60% lower than for control without film and for films without FA (Table 1c).

Several authors have evaluated the effect of different natural antioxidants and natural extracts to extend the shelf life of butter during cold storage. The use of these antioxidants, as food additives, reduced lipid oxidation with respect to the control tests during the period of storage. However, in such studies, the antioxidants were directly incorporated into the butter samples.^{24,37,38} In contrast, our MIH was designed to protect with FA the first layers of butter to counteract the detrimental effects of air. Thus, FA could be released slowly from the active film during storage, avoiding antioxidant additives in the bulk of the food. Studies performed by Otero-Pazos et al.²⁶ showed that FA did not migrate to fat food simulants. However, we observed that FA-loaded MIHs showed high efficiency in prevention of lipid oxidation in butter. Overall, these results suggest that the protection provided by the active films is not due to migration of the active compound to the foodstuff, but the effect of FA on the headspace of the container. FA may act as scavenger of oxygen and/or radicals responsible for the oxidation process, which in turn leads to an extended shelf life of butter. These findings are in agreement with previous results shown in the literature for active packaging films containing natural polyphenols.^{8,39} Interestingly, the affinity of MIHs for FA ensures prolonged retention of the antioxidant in the film, while the limited migration to butter may avoid changes in the organoleptic properties of butter.

7.1.4. Conclusion

Antioxidant active films based on MIHs and FA (a natural antioxidant) were successfully developed. The use of molecularly imprinted polymers for this application is still unusual. However, MIHs represent a useful alternative to conventional packaging materials, such as ethylene-vinyl alcohol copolymer or polyvinyl alcohol, as their composition can be tuned to selectively bind, with a high loading capacity, the target antioxidant improving the antioxidant properties of the resulting active films. Moreover, many of the monomers usually applied for polymer synthesis are authorized for the manufacture of plastic materials intended to come into contact with foodstuff according to the EU legislation, which endorses the selection of the right combination for each application. MIHs preparation is simple and reproducible and the use of a dummy template, as an alternative to FA, for polymer synthesis avoids the problems associated to the presence of the antioxidant during radical polymerization. The FA-loaded MIHs were more effective as butter antioxidant materials than the non-loaded NIHs as oxidation was reduced by 25% after four weeks of butter storage. These results demonstrate the potential of MIHs for the development of antioxidant active packaging materials for use in the food industry.

7.1.5. Supplementary material

7.1.5.1. Polymer library composition

Table 2. Composition of the MIH and NIH libraries. Concentrations are referred to the total volume of monomers. Letters n and i in the formulation codes refer to the NIH and to the MIH, respectively. ABDV was in all cases 10 mM.

Polymer	HFA (mM)	DMAEMA (mM)	1-ALLP (mM)	HEMA (mM)	EDMA (mM)
An				7400	530
Ai	100			7400	530
Cn		200		7400	530
Ci	100	200		7400	530
Gn			200	7400	530
Gi	100		200	7400	530
In			400	7400	530
Ii	100		400	7400	530
Jn			800	7400	530
Ji	100		800	7400	530
Mn		400		7400	530
Mi	100	400		7400	530
Nn		800		7400	530
Ni	100	800		7400	530
Rn			400	7400	530
Ri	200		400	7400	530
Tn		400		7400	530
Ti	200	400		7400	530

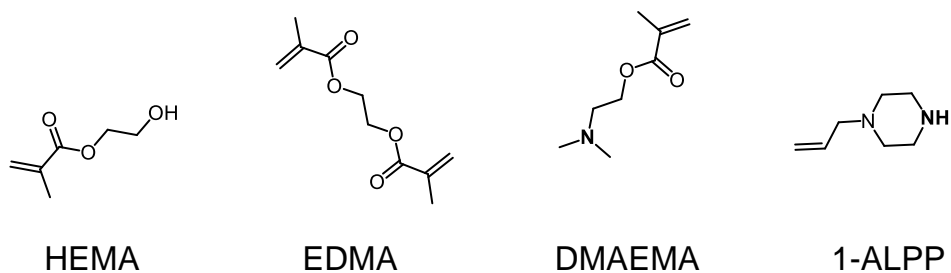
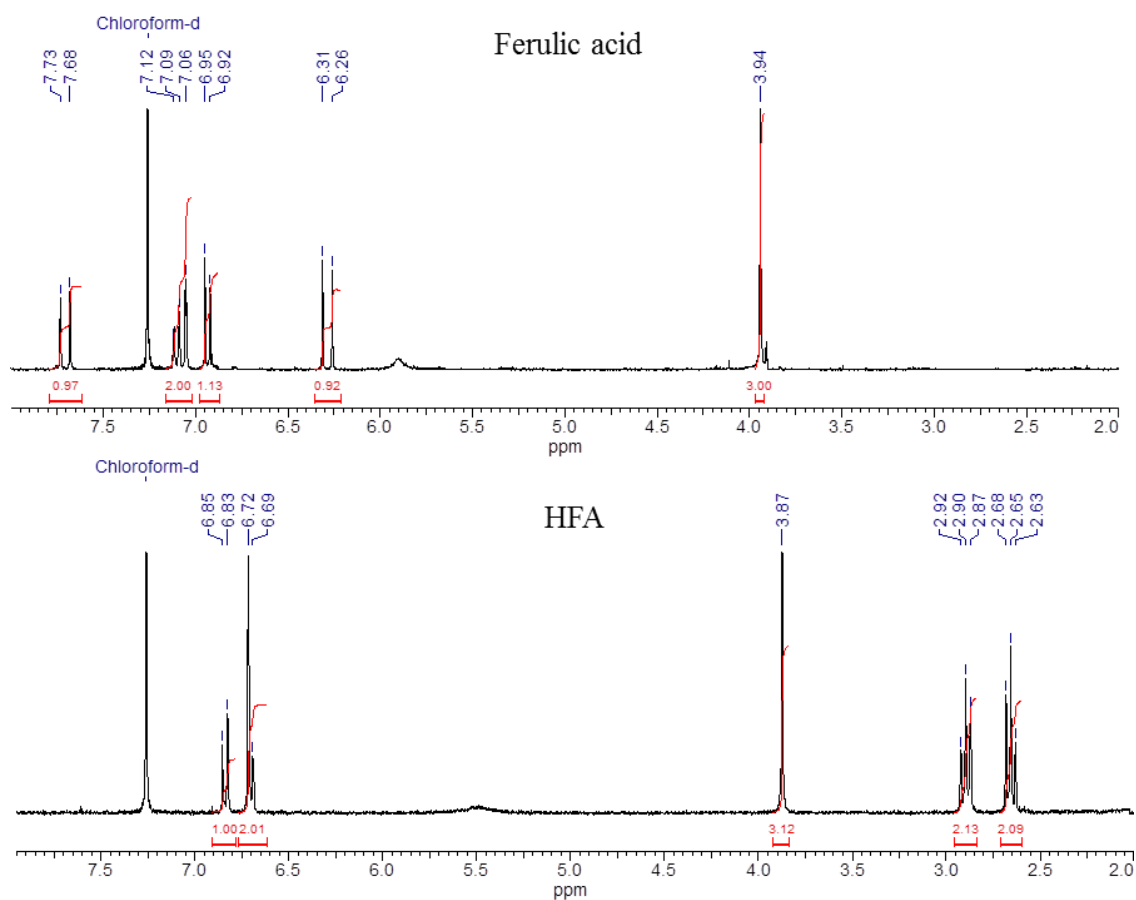


Figure 5. Monomers and cross-linker applied for MIH synthesis.

Table 3. Elemental analysis of the polymers pairs Ai/An, Ii/In and Ti/Tn.

	%C	%N	%H
A Calculated	56.4	0.0	7.7
An	54.0 ± 0.3	0.04 (<LC)	7.3 ± 0.2
Ai	54.2 ± 0.3	0.05 (<LC)	7.4 ± 0.2
I Calculated	56.7	0.51	7.8
Ii	53.8 ± 0.3	0.26 (<LC)	7.5 ± 0.2
In	53.8 ± 0.3	0.26 (<LC)	7.5 ± 0.2
T Calculated	56.1	0.5	7.7
Ti	54.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	7.6 ± 0.2
Tn	54.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	7.6 ± 0.2

7.1.5.2. FA and HFA ^1H -NMR spectra

**Figure 6.** ^1H RMN spectra for FA and HFA in CDCl_3 .

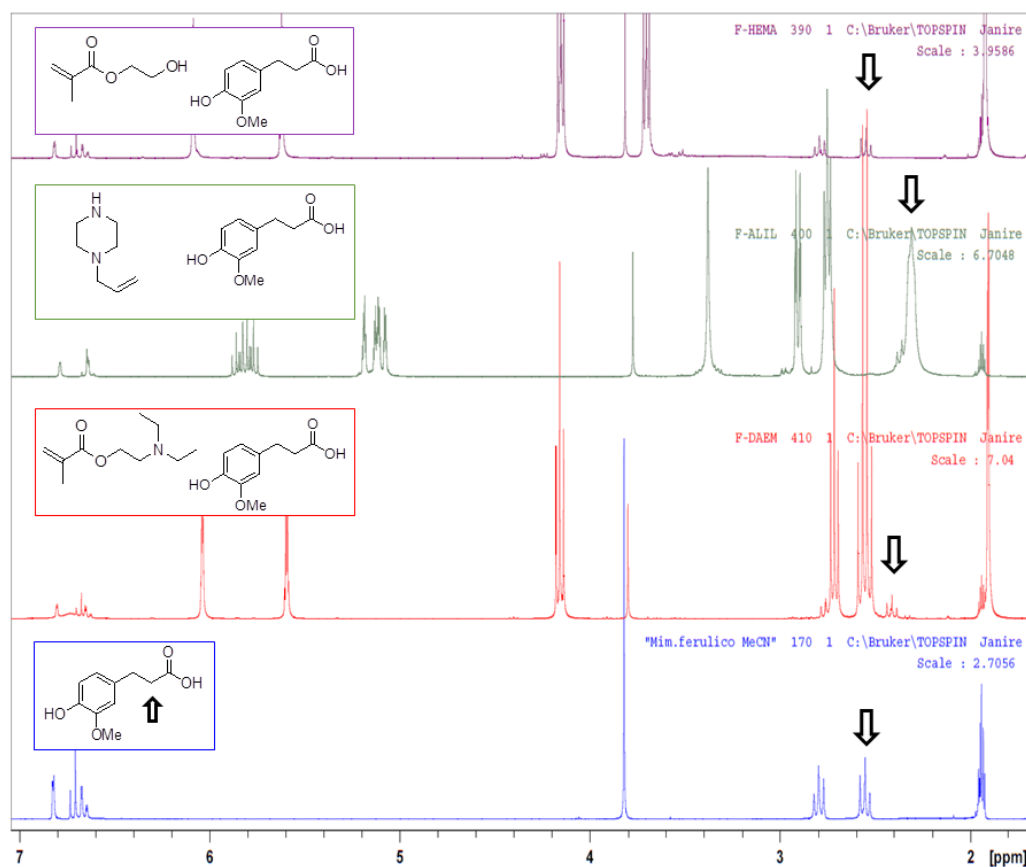
7.1.5.3. ^1H -NMR monomer-template interactions

Figure 7. ^1H RMN spectra of a solution of HFA in CD_3CN (blue) with equivalent amounts of HEMA (violet), 1-ALPP (green) and DMAEMA (red).

7.1.5.4. Binding kinetics

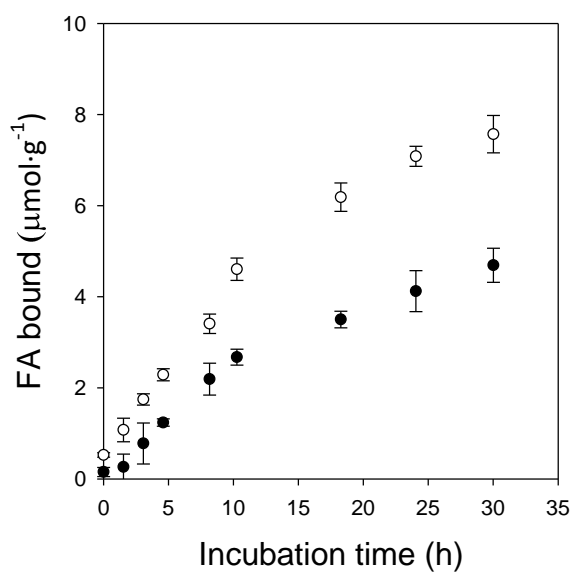
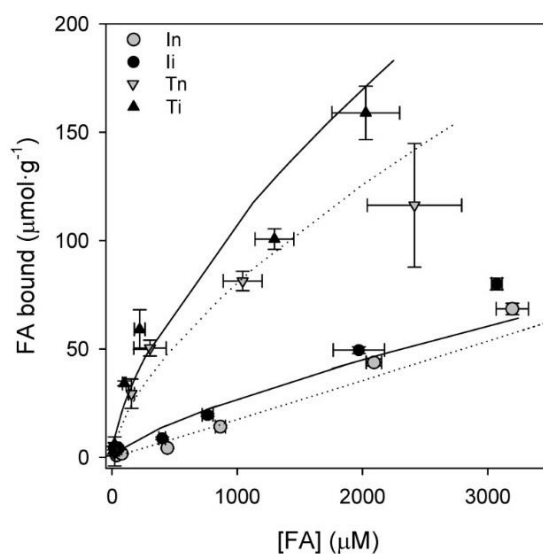
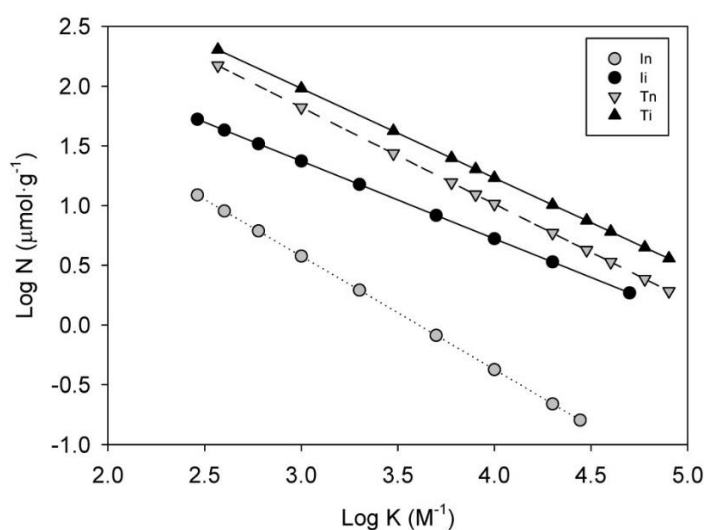


Figure 8. Binding kinetics for the uptake of 0.045 mM FA in the P(DMAEMA-co-HEMA-co-EDMA) hydrogels (T) (n=3, RSD < 8%) by the (●) MIHs and the (○) NIHs in water.

7.1.5.5. Binding isotherms

Table 4. Fitting of the FA isotherms to the Freundlich model ($\alpha < 0.01$). Parameter a is related with the binding affinity and parameter m is the heterogeneity index.

Polymer	m	$\text{Log } a$	R^2	a
In	0.950	4.100	0.963	12592
Ii	0.650	3.388	0.940	2446
Tn	0.809	4.440	0.917	27580
Ti	0.749	4.348	0.943	22289

**Figure 9.** Equilibrium binding isotherms for the uptake of FA by MIHs and NIHs in water ($n = 3$, $\text{RSD} < 14\%$). The experimental data were fitted to a Freundlich (FI) isotherm model: continuous lines for MIHs and dotted lines for NIHs.**Figure 10.** Affinity distributions based on the fitting to the Freundlich model of the FA isotherms, obtained for NIH (In and Tn, grey symbols) and MIH (Ii and Ti, black symbols) networks.

7.1.5.6. Antimicrobial activity of the FA-loaded MIHs

Antimicrobial activity of MIHs with and without FA were assessed against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, and total aerobic mesophilic flora isolated from chicken roti. The evaluation of MIHs with T2 formulation was performed using qualitative and quantitative methods. All the organisms were maintained according to good microbiological practice and checked for purity, by making streak plates and observing for a single species characteristic type of colonies. These organisms were used to prepare cell suspensions of $1\text{-}5 \cdot 10^5$ CFU mL⁻¹ of total aerobic flora and the rest of bacteria, respectively, in phosphate buffered saline (PBS). For the agar diffusion method (qualitative assay), the bacterial inoculum was uniformly spread on sterile nutrient agar Petri dishes (PO5025A, Oxoid). MIHs square pieces (10x10 mm) loaded with FA (T2 formulation) were placed onto the agar containing each bacteria inoculum. The systems were incubated for 24 h at 30 ± 1 °C (total aerobic mesophilic flora) and 36 ± 1 °C (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*), under aerobic conditions. NIHs were used as controls. Tests were performed in duplicate.

ASTM E 2149-01 standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions (quantitative assay) was carried out in duplicate as follows. Cell suspensions were put in contact with 1 g of FA-loaded MIHs and incubated at 30 ± 1 °C and 36 ± 1 °C (depending on the microorganism as stated above) during 1, 3 and 6 days. After incubation, ten-fold serial dilutions of each suspension were made, spread onto different agar plates and incubated at optimal growth conditions of time/temperature in order to quantify the number of colony forming units per mL (CFU mL⁻¹).

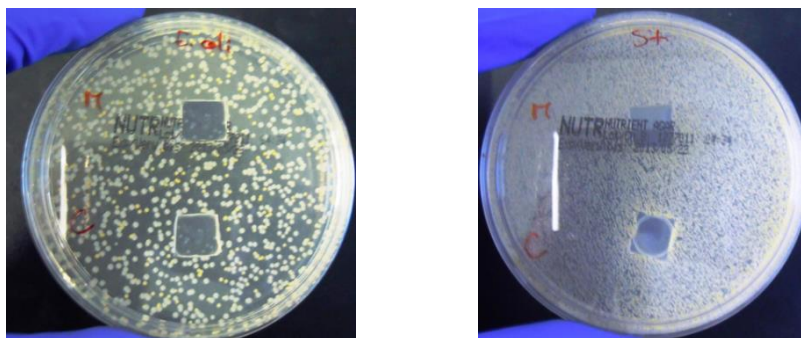


Figure 11. (a) *E. coli* growth in contact with T2 (MIH) and T1(NIH) films; (b) *S. aureus* growth in contact with T2 (MIH) and T1(NIH) films.

Acknowledgements

Work supported by MINECO (IPT-060000-2010-14, CTQ2012-37573-C02-02), and FEDER. The authors thank Feiraco (Sociedad Cooperativa Galega, Ames, Spain) for providing the butter samples. A. Rico-Yuste thanks MINECO for a doctoral grant (FPI).

References

1. J. Kanner, I. Rosenthal, *Pure and Applied Chemistry*, 1992, **64**, 1959.
2. S. Mallia, F. Escher, H. Schlichtherle-Cerny, *European Food Research and Technology*, 2008, **226**, 315-325.
3. S. Mallia, F. Escher, S. Dubois, P. Schieberle, H. Schlichtherle-Cerny, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, **57**, 7464-7472.
4. E. M. Becker, L. R. Nissen, L. H. Skibsted, *European Food Research and Technology*, 2004, **219**, 561-571.
5. F. Shahidi, Y. Zhong, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, ed. F. Shahidi, John Wiley & Sons Inc, Weinheim, 6th edn., 2005, pp. 19-21.
6. L. Barbosa-Pereira, J. M. Cruz, R. Sendón, A. Rodríguez Bernaldo de Quirós, A. Ares, M. Castro-López, M. J. Abad, J. Maroto, P. Paseiro-Losada, *Food Control*, 2013, **31**, 236-243.
7. L. Barbosa-Pereira, I. Angulo, J. M. Lagarón, P. Paseiro-Losada, J. M. Cruz, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2014, **26**, 310-318.
8. L. Barbosa-Pereira, G. P. Aurrekoetxea, I. Angulo, P. Paseiro-Losada, J. M. Cruz, *Meat Science*, 2014, **97**, 249-254.
9. D. A. Pereira de Abreu, P. Paseiro Losada, J. Maroto, J. M. Cruz, *Food Chemistry*, 2011, **126**, 315-320.
10. K. Bentayeb, C. Rubio, R. Batlle, C. Nerín, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, **389**, 1989-1996.
11. S. Gemili, A. Yemenicioğlu, S. A. Altinkaya, *Journal of Food Engineering*, 2010, **96**, 325-332.
12. B. Blanco-Fernandez, M. I. Rial-Hermida, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Journal of Applied Polymer Science*, 2013, **129**, 626-635.

13. M. S. Dopico-García, M. M. Castro-López, J. M. López-Vilariño, M. V. González-Rodríguez, P. Valentão, P. B. Andrade, S. García-Garabal, M. J. Abad, *Journal of Applied Polymer Science*, 2011, **119**, 3553-3559.
14. N. Kumar, V. Pruthi, *Biotechnology Reports*, 2014, **4**, 86-93.
15. S. Gupta, P. S. Sukhija, I. S. Bhatia, *Milchwissenschaft*, 1979, **34**, 205-206.
16. M. C. Figueroa-Espinoza, C. Poulsen, J. Borch Sørensen, M. R. Zargahi, X. Rouau, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 6473-6484.
17. H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, H. Taniguchi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 2161-2168.
18. I. M. Heinonen, P. J. Lehtonen, A. I. Hopia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, **46**, 25-31.
19. M. J. Whitcombe, N. Kirsch, I. A. Nicholls, *Journal of Molecular Recognition*, 2014, **27**, 297-401.
20. C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Journal of Chromatography B*, 2004, **804**, 231-245.
21. A. Ribeiro, F. Veiga, D. Santos, J. J. Torres-Labandeira, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 701-709.
22. C. Alvarez-Lorenzo, H. Hiratani, J. L. Gómez-Amoza, R. Martínez-Pacheco, C. Souto, A. Concheiro, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, **91**, 2182-2192.
23. R. J. Umpleby, S. C. Baxter, A. M. Rampey, G. T. Rushton, Y. Chen, K. D. Shimizu, *Journal of Chromatography B*, 2004, **804**, 141-149.
24. A. Ayar, M. Özcan, A. Akgül, N. Akin, *Journal of Food Lipids*, 2001, **8**, 15-25.
25. *Official Journal of the European Union* 2004, European Commission Regulation (EC) N° 1935/2004, 338/4-338/17.
26. P. Otero-Pazos, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, R. Sendón, E. Benito-Peña, V. González-Vallejo, M. C. Moreno-Bondi, I. Angulo, P. Paseiro-Losada, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, **62**, 11215-11221.
27. M. E. Byrne, K. Park, N. A. Peppas, *MRS Proceedings*, 2002, **724**, 193-198.
28. S. H. Gehrke, D. Biren, J. J. Hopkins, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1995, **6**, 375-390.
29. C. Peniche, M. E. Cohen, B. Vázquez, J. San Román, *Polymer*, 1997, **38**, 5977-5982.
30. M. F. Refojo, *Journal of Applied Polymer Science*, 1965, **9**, 3417-3426.

31. P. van de Wetering, N. J. Zuidam, M. J. van Steenbergen, O. A. G. J. van der Houwen, W. J. M. Underberg, W. E. Hennink, *Macromolecules*, 1998, **31**, 8063-8068.
32. F. Khalili, A. Henni, A. L. L. East, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2009, **54**, 2914-2917.
33. H. Hiratani, C. Alvarez-Lorenzo, *Biomaterials*, 2004, **25**, 1105-1113.
34. A. Pardo , L. Mespouille, P. Dubois, B. Blankert, P. Duez, *Chemistry – A European Journal*, 2014, **20**, 3500-3509.
35. L. A. Tom, N. A. Schneck, C. Walter, *Journal of Chromatography B*, 2012, **909**, 61-64.
36. A. M. Rampey, R. J. Umpleby, G. T. Rushton, J. C. Iseman, R. N. Shah, K. D. Shimizu, *Analytical Chemistry*, 2004, **76**, 1123-1133.
37. E. Dagdemir, S. Cakmakci, E. Gundogdu, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009, **111**, 1118-1123.
38. S. Ozturk, S. Cakmakci, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006, **108**, 951-959.
39. C. Nerín, L. Tovar, J. Salafranca, *Journal of Food Engineering*, 2008, **84**, 313-320.

7.2. Furfural determination with disposable polymer films and smartphone-based colorimetry for beer freshness assessment

Este artículo presenta el desarrollo de un sensor colorimétrico basado en fibra óptica para la determinación del furfural, una molécula utilizada como parámetro de frescura, y su aplicación para la evaluación del envejecimiento de la cerveza.

La síntesis de las membranas poliméricas en formato de hidrogel se realizó siguiendo un procedimiento similar al descrito el trabajo recogido en el apartado 7.1. Con el objetivo de lograr una mayor sensibilidad al analito, se optimizaron diversos parámetros físico-químicos característicos de las membranas sensoras como su composición y espesor, el tiempo de incubación y la composición de las disoluciones de medida. Tras la caracterización analítica del material, se demostró la selectividad de los polímeros por el furfural frente a otros aldehídos presentes en la cerveza. Los resultados obtenidos en una mezcla EtOH/agua, que simula la composición de la cerveza, se validaron empleando HPLC-DAD. Asimismo, se utilizó el método desarrollado para el análisis de muestras de cerveza con diferentes tiempos de almacenaje, y por tanto con diferente contenido en furfural, demostrando la relación lineal existente entre ambos factores. Las medidas se llevaron a cabo empleando un equipo portátil de fibra óptica. En paralelo, se desarrolló una aplicación de móvil basada en el sistema Android® que permitió determinar la concentración de furfural en las muestras empleando un *smartphone* como alternativa al sistema de fibra óptica. La principal novedad de esta investigación es que por primera vez se sintetizó un material para la determinación rápida y selectiva de furfural en cerveza.

Las etapas de las que consta este trabajo se pueden resumir en:

1. Síntesis de las membranas poliméricas.
2. Optimización de los parámetros de ensayo.
3. Caracterización analítica de las membranas.
4. Desarrollo y aplicación de una *app* basada en Android® para la lectura de las membranas sensoras.
5. Análisis de muestras de cerveza.

Furfural Determination with Disposable Polymer Films and Smartphone-Based Colorimetry for Beer Freshness Assessment

Alberto Rico-Yuste,^{§,†} Victoria González-Vallejo,^{§,†} Elena Benito-Peña,^{*,†} Tomás de las Casas Engel,[‡] Guillermo Orellana,[‡] and María Cruz Moreno-Bondi^{*,†}

[†]Department of Analytical Chemistry and [‡]Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

Reproduced from:

Analytical Chemistry 2016, **88**, 3959-3966

Copyright © 2016, with permission from American Chemical Society

Abstract

We have developed disposable color-changing polymeric films for quantification of furfural, —a freshness indicator—, in beer using a smartphone-based reader. The films are prepared by radical polymerization of 4-vinylaniline, as furfural-sensitive indicator monomer, 2-hydroxymethylmethacrylate as co-monomer and ethylene dimethylmethacrylate (EDMA) as cross-linker. The sensing mechanism is based on the Stenhouse reaction in which aniline and furfural react in acidic media with generation of a deep red cyanine derivative, absorbing at 537 nm, which is visible to the naked eye. The colorimetric response has been monitored using either a portable fiber-optic spectrophotometer or the built-in camera of a smartphone. Under the optimized conditions, a linear response to furfural in beer was obtained in the 39 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ range, with a detection limit of 12 $\mu\text{g L}^{-1}$, thus improving the performance of other well-established colorimetric or chromatographic methods. The novel films are highly selective to furfural and no cross-reactivity has been observed from other volatile compounds generated during beer ageing. A smartphone application (app), developed for Android® platforms, measures the RGB color coordinates of the sensing membranes after exposure to the analyte. Following data processing, the signals are converted into concentration values by pre-loaded calibration curves. The method has been applied to determination of furfural in ale beers with different storage times at room temperature.

A linear correlation ($r > 0.995$) between the storage time and the furfural concentration in the samples has been confirmed; our results have been validated by HPLC with diode-array detection.

7.2.1. Introduction

Globally, more people drink beer than any other alcoholic beverage, making it the third most popular beverage of any kind in the world.¹ The flavor of a particular beer brand is considered one of the most important quality parameters of the product and must be kept constant to satisfy the costumer expectations. However, depending on the beer type and its storage conditions, such flavor may be altered as a result of changes in the chemical composition produced during beer aging, with the corresponding loss of the characteristic sensory properties of a particular brand. Currently, breweries are very interested in gaining knowledge on the beer-aging phenomenon as, unlike wines, it is regarded to exert a negative effect on flavor quality. Moreover, due to market globalization, new technological processes are being implemented to control flavor stability, thus increasing the product shelf life and product exports.

Generation of volatile aldehydes (Figure 6, Supporting Information, section 7.2.5.1.) is one of the main causes of beer flavor deterioration during both brewing and storage. The concentration of these chemicals depends on different factors, such as the type of malt used in the brewing process or the storage conditions (packaging, temperature, light, etc.) that will affect the flavor deterioration rate. The main process involved in the formation of volatile aldehydes is the Maillard reaction.^{2,3} It involves the initial reaction of reducing sugars with proteins, amino acids, peptides or amines, as well as subsequent reactions which result in a complex mixture of molecules responsible for a range of odors and flavors in the beer. Two Maillard products, namely the heterocyclic aldehydes furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF), have been found to be sensitive indicators of heat-induced flavor changes to beer. Their concentration depends on the beer composition and increases with the storage time.⁴

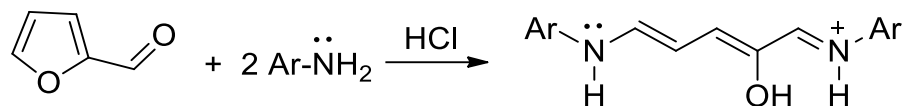
Traditionally, the organoleptic quality of beer has been assessed by sensory evaluation. However, taste testing suffers from the human limitations, such as personal bias and the lack of a quantitative assessment. Therefore, the determination of

furfuraldehydes in food samples is usually carried out nowadays by chromatographic methods such as gas chromatography (GC)⁵⁻⁷ or high performance liquid chromatography (HPLC).⁸⁻¹⁰ The detection limits can be improved using pre-column derivatization reactions with various compounds such as dinitrophenylhydrazine (DNPH), which is commonly applied to the analysis of aldehydes in honey,¹¹ bakery products,¹² alcoholic¹³ and non-alcoholic beverages,¹⁴ or (O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine) (PFBOA) widely used in beer analysis.⁴ Malfliet et al. have reported a method to detect furfural and other aldehydes in pale lager beers, using headspace-solid phase micro-extraction (HS-SPME) with on-fiber PFBOA derivatization and GC/MS.¹⁵ This method provides accurate and reproducible results, yet it shows several drawbacks such as a time-consuming sample preparation protocol and the use of expensive instrumentation that limit its application.

Chemosensors have shown to be an alternative to traditional analytical methods for simple and fast determinations of a wide range of compounds in complex matrices.¹⁶ These devices are usually low cost and, in the case of colorimetric sensors, signal changes can be measured by the naked eye or using portable spectrophotometers and even the digital camera of smartphones.¹⁷

Although colorimetric analysis of furfural in wine, beer and other beverages is well established,¹⁸ to the best of our knowledge, there are no chemical sensors for determination of furfural in food samples, although several devices have been developed for the analysis of this aldehyde in other matrices. For example, Uttamchandani et al.¹⁹ described a colorimetric sensor, based on the Stenhouse reaction (Scheme 1),^{20,21} for the analysis of furfural in oil. The sensing material consisted of a sol-gel, doped with aniline acetate, that allowed determination of furfural with a detection limit of 0.1 mg L⁻¹ and a response time of 135 min (for a 75% signal change), at room temperature. In a different approach, Cennamo et al.²² reported the development of an optical sensor for furfural analysis in power transformer oil using a molecularly imprinted polymer, immobilized at a gold planar surface over a plastic optical fiber (POF). The variation of the resonance wavelength ($\Delta\lambda_{\text{ex}}$) was correlated with the concentration of furfural up to 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ with a detection limit of 9 $\mu\text{g L}^{-1}$. However, none of these approaches have been applied to the determination of furfural in food or

in aqueous rich samples. Moreover, although these methods show low detection limits, they present a narrow response range of limited applicability for beer freshness monitoring.¹⁵



Scheme 1. The Stenhouse reaction between furfural and an aromatic amine. ^{20,21}

Herein, we report on the development of disposable sensors for the determination of furfural in beer using colorimetric detection. The sensing membranes were obtained by radical polymerization using 4-vinyl aniline as furfural-responsive monomer, 2-hydroxymethylmethacrylate as co-monomer to increase the polymer hydrophilicity and ethylene glycol dimethylmethacrylate (EDMA) as crosslinker (Scheme 2, Supporting Information, section 7.2.5.2.). In this unique approach, the aniline moiety, responsible for the color-developing reaction with furfural, remains covalently linked to the polymeric backbone at all times, thus avoiding reagent leakage. In the presence of furfural, the sensing membranes change their color from pale yellow to pink yielding a linear correlation between the furfural concentration and the absorbance at 537 nm. The method has been applied to the determination of furfural in pale lager beer samples and its concentration has been correlated with the beer aging. In order to facilitate the application of this sensor to “in situ” analysis of furfural, a user-friendly Android®-based app has been developed. The results have been validated by HPLC-DAD.

7.2.2. Experimental Section

7.2.2.1. Materials

All reagents were of chromatographic grade and used without further purification. Ultra-pure water was from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Furfural (99%), acetaldehyde (≥99.5%), 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA, 97%), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA, 98%) and dimethyldichlorosilane (99%) were all provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 5-Hydroxymethyl-2-furfuraldehyde (HMF, ≥98%) was from Alfa Aesar

(Karlsruhe, Germany). 2-Methyl propanal (99%), hexanal (97%), benzaldehyde (99.5%), phenylacetaldehyde (90%) and trans-2-nonenal (97%) were a gift from the beer manufacturer Mahou-San Miguel (MSM) research center (Lleida, Spain). 4-Vinylaniline (VA, 98%) was from Apollo Scientific (Bredbury, Cheshire, UK). 2,2-Azobis-(2,4-dimethylvaleronitrile) (ABDV) was from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Beer samples with different storage days were supplied by MSM. Two solutions were used for the measurements, namely water/ethanol (80/20; *v/v*) after the legislation for alcoholic drinks,²³ and water/ethanol (94.6/5.4; *v/v*), according to the usual ethanol content in pale larger beers. Stock solutions of 1 mg/mL of each analyte were prepared by dissolving the appropriate amount in the corresponding simulant. The stock solutions were stored at 4 °C in the dark.

7.2.2.2. Instrumentation

Absorbance measurements were carried out with a portable fiber-optic spectrometer (Maya 2000 Pro, Ocean Optics, USA) connected to a randomly bifurcated borosilicate optical glass fiber (Vydas, UK; 2.5 m long, 3.0 mm diameter at the common branch, 1.6 mm diameter at each leg). Our system uses a high-intensity white light LED as light source (SL1-LED, StellarNet, Fla., USA). The mini-spectrometer acquisition and signal display is provided by a laptop computer connected via its USB port using the Ocean Optics Spectrasuite® software *v2.0*. The smartphone Samsung Galaxy S4 (Samsung group, Seoul, South Korea) runs the developed application, and includes a 5" screen with a resolution of 1920 × 1080 pixels and an integrated camera of 13 megapixels with CMOS autofocus sensor. Pictures were saved with a 2448 × 3264 pixels size, leading to ca. 1 MB files. The chromatographic system consisted of a HP-1100 series high performance liquid chromatograph from Agilent (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, on-line degasser, autosampler, automatic injector, column thermostat, and diode-array detector (DAD).

7.2.2.3. Synthesis of the polymeric films

The composition of the sensor library assayed in this work is shown in Table 1. Monomers and cross-linkers were mixed in the specified amount and the solution was purged with Ar for 10 min. Then, the solution was injected into the polymerization

molds formed by two glass plates (10 x 10 cm) previously treated with dimethyldichlorosilane, held together and separated by a 0.9 mm-thick silicone spacer (1 cm wide) (Figure 7, Supporting Information, section 7.2.5.2.).²⁴ The molds were placed in an oven at 70 °C for 24 h. After polymerization, the resulting films were removed from the molds and dip into boiling water for 15 min to extract unreacted components. Then they were cut into 6-mm diameter disks and washed with water-ethanol (80/20 *v/v*) until complete removal of the unreacted monomers as checked by HPLC-DAD. Finally, the disks were dried in a vacuum oven at 45 °C for 24 h and stored at 4 °C in the dark.

Table 1. Mole ratio of the components used to build the furfural sensor library.

Formulation	4-vinylaniline (mmol)	HEMA (mmol)	EDMA (mmol)	ABDV (mmol)
NVE-1	3.0	18.5	1.33	40
NVE-2	7.5	18.5	1.33	40
NVE-3	7.5	14.4	1.33	40
NVE-4	12.5	18.5	1.33	40
NVE-5	12.5	9.1	1.33	40

7.2.2.4. Measurements with the portable fiber-optic spectrometer

The sensing membranes were incubated for 1 h at room temperature in 10 mL of either standard furfural or beer samples spiked with 200 µL of 1.5 M HCl. Then, they were air-dried for 1 min and placed at the common end of the bifurcated fiber-optic bundle using a hollow stainless steel screw cap. For calibration purposes, standard solutions of furfural were prepared in water-ethanol (80/20 or 94.6/5.4, *v/v*) mixtures at six concentration levels in the range from 0 to 500 µg L⁻¹. The beer samples were diluted 1 or 4-fold (*v/v*) with water-ethanol (94.6/5.4, *v/v*) to a final volume of 10 mL. The membranes were placed over a matt white background and the absorption spectrum was recorded in the 470 - 700 nm range, with a 10-scan average of 37 ms integration time per scan. For calibration purposes, the analytical signal was set at 537 nm and the background was monitored at 690 nm. All experiments were carried out in triplicate.

7.2.2.5. Measurements with the smartphone application

The polymeric film disks were immersed in 10 mL standard furfural solutions (five concentration levels in the 50–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ range), prepared in water-ethanol (94.6/5.4, *v/v*) as described in section 7.2.2.4. Then, the disks were placed in a matt white background in a handmade white light box, illuminated with two LED lamps (3.0 W, warm light 2700 K) at both sides of the box to ensure homogeneous illumination. The smartphone was placed in a holder, at a fixed distance from the sensing disks. The images were obtained using the smartphone built-in camera at the highest possible resolution. Next, they were saved in JPEG format and exported to the “*Furfural Detector v0.4*” application, developed in this work, without any further processing.

The “*Furfural Detector v0.4*” software app (Figure 1) was designed for any platform running Android® 4.2.2. The application is open source and available at <https://github.com/otoumas/Furfural-Detector>. Our software was designed to read color information from the JPEG digital images captured with the smartphone built-in camera and to carry out the colorimetric analysis. The application installed in the smartphone shows a simple menu to perform the measurements or to analyze the images of the disks collected after the analysis of either furfural standards or beer samples.

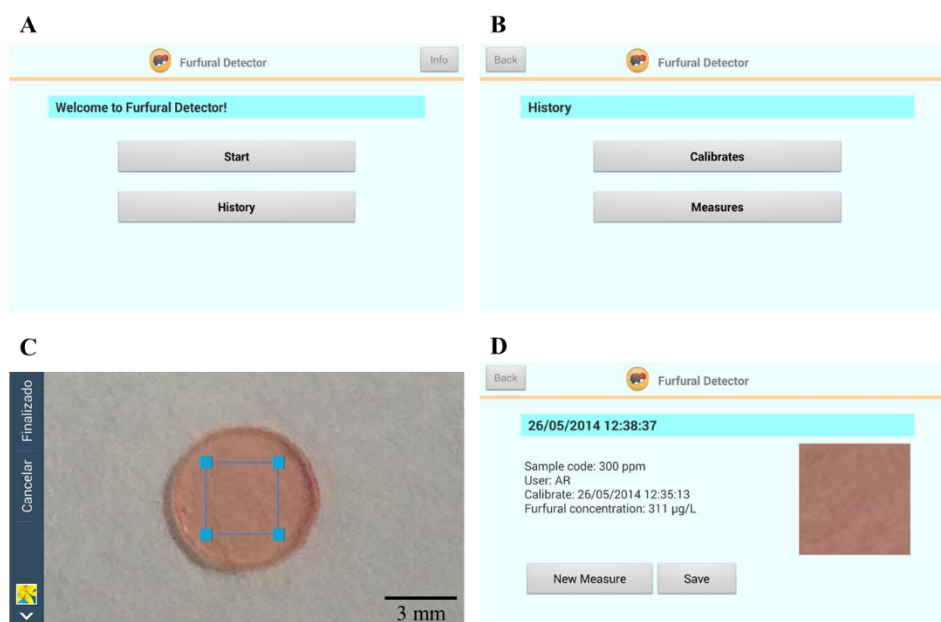


Figure 1. Screen captures of the developed Android app showing: (A) the main menu; (B) the history menu; (C) the screen with acquired sensor images and the selection zone, and (D) the final screen with processed images and the results after interpolation. The application was run on a Samsung Galaxy S4 smartphone.

The application allows selection of the image and the disk area of interest with a square frame; once selected, the software reads the color information of each pixel inside the selected area without any external color reference. The signal transduction is based on the mean values of the R, G and B channels and the mathematical algorithm used for measurements is the (R-G)/B value that allows correction for differences in the disk illumination. A calibration plot was constructed in the 50–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ furfural range.

7.2.2.5. Validation by HPLC-DAD

Chromatographic validation was performed on a LUNA[™] C18 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm beads) HPLC column from Phenomenex (Torrance, CA, USA). An isocratic program was used with the mobile phase, combining 90% of solvent A (Milli-Q water with 0.01% TFA) and 10% of solvent B (ACN with 0.01% TFA) during 16 min. The analyses were performed at a flow rate of 1 mL min⁻¹ and the column temperature was kept at 25 °C. The injection volume was 100 μL and furfural eluted at 10.3 min. The UV detector wavelength was set at 284 nm. Linear calibration graphs were obtained in the 50–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ range for furfural ($r > 0.9999$).

7.2.3. Results and discussion

The fabrication of polymeric films to detect furfural using aniline-based functional monomers has not been described so far.²⁵ This strategy allows to overcome some of the problems associated to the use of aniline derivatives physically entrapped in polymeric networks for furfural determination, such as a low sensitivity and reproducibility,^{19,26} and provides a significant improvement over homogeneous determinations in terms of sensitivity and ease of analysis.¹⁸ This paper describes, for the first time, the development of methacrylate-based disposable sensing films, based on vinylaniline (VA) as furfural-sensitive polymerizable probe and its successful application for beer freshness monitoring.

7.2.3.1. Synthesis of furfural-responsive polymer films

The sensing layers were prepared by free radical polymerization initiated by ABDV. The pre-polymerization mixture consisted of VA, as the signaling monomer and EDMA as cross-linker. In addition, HEMA was included in the pre-polymerization

mixture as diluent monomer to impart water compatibility^{27,28} and to enhance the uptake of furfural from aqueous-rich samples, such as beer.

Five films were prepared containing different concentrations of VA, HEMA and EDMA (Table 1) to evaluate the effect of the polymer composition on the sensitivity of the resulting furfural-sensitive disks. The latter were immersed in water-ethanol (80/20, *v/v*) solutions containing HCl (final concentration 29 mmol L⁻¹) and furfural in the 0 – 500 µg L⁻¹ concentration range (*n* = 3). The concentration of ethanol in the test medium (food simulant) was selected following the regulations provided by the EU for alcoholic beverages with an alcohol content of up to 20 %.²⁹ After equilibration for 1 h, the disks were removed from the samples and the color change was measured using a fiber-optic mini-spectrophotometer (section 7.2.2.4). As shown in Table 2, a linear correlation (*r* > 0.998) between the absorbance at 537 nm and furfural concentration was obtained for NVE-1, NVE-2 and NVE-3. However, the NVE-4 and NVE-5 films were very fragile and broke down easily upon incubation in water-ethanol solutions of furfural; therefore, they were discarded for further assays.

The sensitivity of the furfural-responsive films was greatly affected by the presence of HEMA in the polymerization mixture. A decrease in the concentration of HEMA (NVE-3), keeping constant the amount of VA, provided higher sensitivity; however, the reproducibility of the analysis was also significantly worst (Figure 8, Supporting Information, section 7.2.5.3.).

Table 2. Analytical figures of merit for the furfural-sensitive films prepared with different HEMA concentrations. Calibration standards of furfural (0 – 500 µg L⁻¹) were prepared in water-ethanol (80/20, *v/v*). Incubation time: 1 h (*n* = 3). The actual calibration curves are shown in Figure 8 (Supporting Information, section 7.2.5.3.).

Formulation	NVE-1	NVE-2	NVE-3
Slope x 10⁴ (L µg⁻¹)	4.1 ± 0.3	9.4 ± 0.5	27 ± 1
Intercept x 10³ (a.u.)	3 ± 7	10 ± 10	10 ± 30
LOD (µg L⁻¹)	19	12	14
LR (µg L⁻¹)	62 – 500	41 – 500	46 – 500
<i>r</i>	0.9986	0.9994	0.9992

In contrast, higher amounts of HEMA in the polymer formulation (NVE-1 and NVE-2) resulted in more flexible membranes with better mechanical stability. This finding can be explained by considering the hydrophilic character of the HEMA monomer that facilitates the diffusion of water through the polymer network. Moreover, HEMA contributes to the flexibility and stability of the sensing layers, as well as to the accessibility of the analyte to the VA reagent.³⁰ In this way, the NVE-2 polymer composition was selected for further optimization of the sensor.

7.2.3.2. Assay optimization

Several parameters influencing the sensor performance namely, the acid catalyst concentration (29 mmol L⁻¹ of HCl) and the polymer disk thickness (0.5 mm) were first optimized and the results are collected in the Supporting Information (Figure 9 and Figure 10, sections 7.2.5.4. and 7.2.5.5., respectively). The effect of the incubation time of the disks in standard solutions of furfural (0 – 750 µg L⁻¹ in 80/20 (*v/v*) water-ethanol) on their absorbance is shown in Figure 2. The sensitivity of the sensor increased with the incubation time and, finally, 60 min were selected for all subsequent assays as a compromise between the response time and the sensitivity of the assay. This value favorably compares with the analysis time of other furfural-responsive probes embedded in different supports.¹⁹

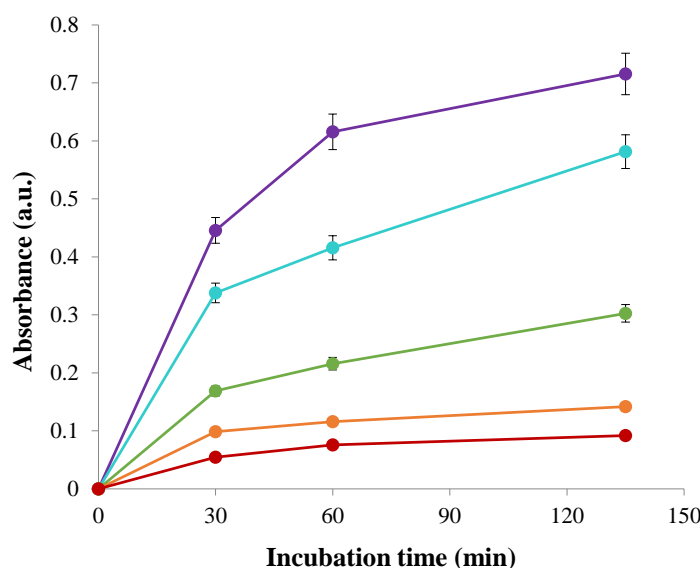


Figure 2. Effect of the incubation time (30, 60 and 135 min) on the absorbance at 537 nm of the films incubated with 10 mL of water-ethanol (80/20; *v/v*) solutions spiked with furfural at (red) 75, (orange) 125, (green) 250, (cyan) 500 and (purple) 750 µg L⁻¹ concentration levels. (*n* = 3; RSD ≤ 5%).

It is well-known that the presence of ethanol may lead to dehydration of pHEMA hydrogels,³¹ which can negatively affect analyte diffusion to the reactive sites in the membrane leading to a corresponding decrease on sensor sensitivity. Thus the response of the sensing films to furfural (0 - 500 $\mu\text{g/L}$) was evaluated in hydro-alcoholic mixtures with increasing ethanol content (0, 5.4 y 20 %; v/v). As shown in Figure 11 (section 7.2.5.6.), no significant differences were observed (confidence level 95%) between the slopes of the calibration plots obtained in the absence and in the presence of ethanol demonstrating the suitability of the polymeric films for the analysis of furfural in beverages with up to 20% alcohol by volume.²³

For quantification and validation purposes, UV-vis spectra were acquired using a fiber-optic spectrometer (see section 7.2.2.4). The sensing films were incubated in 10 mL of water-ethanol mixtures, with an alcohol content commonly found in Spanish pale lager beers (94.6/5.4, v/v), containing furfural at concentrations ranging from 0 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. As anticipated, the absorbance at 537 nm raised linearly with increasing concentrations of furfural, with a corresponding variation in the color of the films from pale yellow to red-magenta. This variation could be readily detected visually (Figure 3). As shown in Figure 3a, the linear response range spans from 39 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 9$; $r^2 = 0.999$), a range that includes the furfural concentrations usually present in beers ready for public consumption.⁶ Calibration resulted in a limit of detection of 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ (calculated as three times the standard deviation of the blank measurements), a value similar or lower to those obtained by chromatography^{11,13} or reported sensors.¹⁹

Interestingly enough, a furfural concentration of 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, which is the typical value in pale beer samples aged roughly 6 months at 25 °C,¹⁵ can be easily visually distinguished from the control sample (absence of furfural).

Sensor precision was assessed by recovery studies in terms of repeatability and reproducibility over an extended period of time. For the repeatability study, water-ethanol (94.6/5.4, v/v) mixtures were spiked with different volumes of the furfural stock solution and made up to a final volume of 10 mL. The final concentration of furfural in the samples was 150, 300 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The solutions were measured by the same operator using sensor films from the same batch.

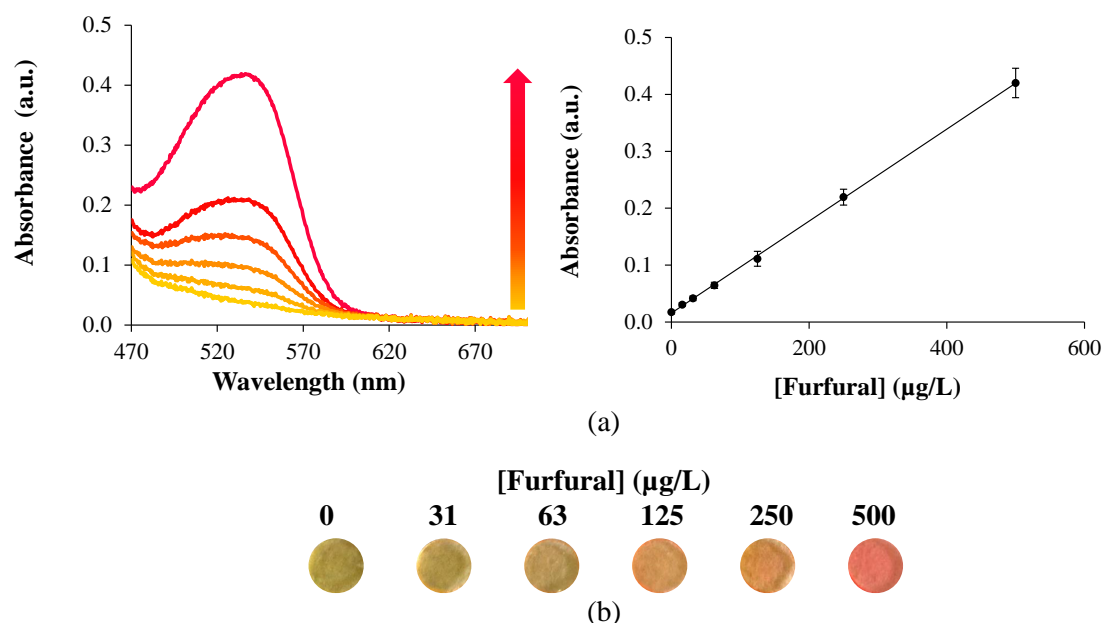


Figure 3. (a) Left, absorption spectra of the polymeric films in water/ethanol (94.6/5.4, v/v) mixtures containing furfural at (yellow) 0, (yellow-orange) 31, (orange) 63, (red-orange) 125, (red) 250 and (bright red) 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Right, representative calibration plot ($n = 9$; $\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$). (b) Images of the polymeric films obtained with the smartphone.

For the reproducibility tests, different operators carried out the measurements using sensor films from different batches, prepared over a 6-month period. As shown in Table 3, mean recoveries ranged from 95 to 108%, with RSDs $< 5\%$, both for the repeatability and reproducibility studies, demonstrating the excellent precision of the polymer films that surpasses the performance of other methods for furfural determination described in the literature.^{32,33}

Table 3. Method accuracy and precision.

[Furfural] added ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repeatability			Reproducibility		
	Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)
500	540	108	5	530	106	3
300	297	99	1	285	95	3
150	150	100	2	145	97	5

The selectivity of the sensing films is crucial for an unambiguous monitoring of freshness markers. Therefore, we investigated the cross-reactivity of the furfural-sensitive polymers to other aldehydes typically found in aged beer, namely 5-hydroxymethylfurfural (HMF), acetaldehyde, 2-methylpropanal, hexanal,

benzaldehyde, phenylacetaldehyde and *trans*-2-nonenal. Only HMF induced some response at high concentration levels ($\text{LOD}_{\text{HMF}} = 1 \text{ mg L}^{-1}$) (Figure 4). However, its cross-sensitivity was negligible at the concentrations usually present in beer, even for the long aged ones ($34 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)¹⁵. These results evidence the remarkable selectivity of the polymeric films developed in this work for furfural analysis and represent a major improvement over most commercially available aldehyde assays.³⁴ The sensors were applied to the analysis of furfural in water-ethanol (94.6/5.4, *v/v*) samples spiked with furfural at six concentration levels (75 - 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) and the results were successfully validated by HPLC-DAD as shown in Table 6 (Supporting Information, section 7.2.5.8.).

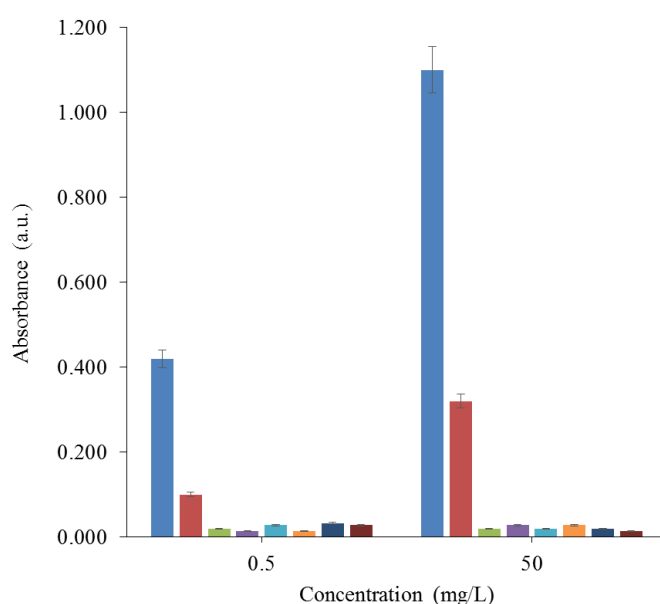


Figure 4. Evaluation of the cross-sensitivity of the furfural-sensitive polymeric films in the presence of other aldehydes usually present in aged beer. Measuring conditions: 10 mL of water-ethanol (94.6:5.4, *v/v*) mixtures fortified with furfural or the tested aldehyde, at 0.5 and 50 mg L⁻¹. (Blue) Furfural, (maroon) 5-hydroxymethylfurfural (HMF), (green) benzaldehyde, (purple) 2-methylpropanal, (light blue) *trans*-2-nonenal, (yellow) phenylacetaldehyde, (dark blue) hexanal, (brown) acetaldehyde.

7.2.3.3. Smartphone-based colorimetric read-out

An additional readout method was developed to determine furfural by CMOS imaging based on the RGB color variation acquired and processed with a smartphone. Several empirical formulas were evaluated to correlate the image data with the furfural concentration (data not included). The best linear correlation was obtained using the (R-G)/B approach. Portability and ease of use were ensured by the development of the Android® app “*furfural detector v0.4*” (see section 7.2.2.5). For calibration purposes, the

polymer films were incubated for 1 h in 10 mL of water-ethanol (94.6/5.4, v/v) solutions containing furfural in the 50 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ range. Then, the disks were placed into the measuring box, imaged, and the smartphone app was used to calculate the fitting parameters and the calibration plot (Figure 5). The linear range spanned from 50 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, with a similar sensitivity to that obtained with the fiber-optic spectrometer.



Figure 5. (A) Photographs of sensor disks after incubation in 10 mL of water-ethanol (94.6/5.4, v/v) mixtures fortified with 50 -500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of furfural. (B) Screen captures of the developed software application showing the calibration plot and the fitting parameters.

For validation purposes, the samples ($n = 3$) were analyzed by the smartphone and HPLC-DAD (Table 4). The results, shown in table 5, confirmed that no statistically significant differences in the averages values at any furfural concentration level were observed demonstrating the excellent performance of the developed smartphone-based colorimetric readout method, which is significantly cheaper, more portable and accessible for in-situ analysis of furfural than the chromatographic technique.

Table 4. Method validation ($n = 3$).

[Furfural] ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
Added	Found (<i>Smartphone</i>)	Found (<i>HPLC-DAD</i>)
50	55 (5)	53 (1)
100	89 (10)	92 (2)
200	225 (24)	194 (4)
300	344 (49)	298 (6)
500	483 (48)	494 (5)

(SD) = Standard deviation

7.2.3.4. Analysis of pale lager beer samples

The furfural-sensitive films were applied to the determination of this aldehyde in pale lager beer samples as a freshness indicator parameter. In order to investigate potential matrix effects, the beer samples, previously checked for the absence of the analyte ($< \text{LOD}$), were diluted with water-ethanol (94.6/5.4, v/v) and spiked with increasing concentrations of furfural ranging from 0 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Then, they were analyzed using the procedures described above (sections 7.2.2.4 and 7.2.2.5). Figure 13 (Supporting Information, section 7.2.5.9.) shows the comparison of the calibration curves obtained in non-diluted beer, after 1-fold dilution, and after 4-fold dilution with a water-ethanol mixture (94.6/5.4, v/v). No statistically significant differences were observed between the calibration plots obtained in water-ethanol (94.6/5.4, v/v) and the 4-fold diluted beer standards demonstrating the applicability of the sensor for real sample analysis.

Finally, samples of pale lager beer with different storage times at room temperature were collected at Mahou-San Miguel brewery (Lleida, Spain), and the furfural concentration was evaluated using the sensitive disks (Table 5) with very good reproducibility ($\text{RSD} < 5\%$). A linear correlation was confirmed between the storage time and furfural concentration (Figure 14, Supporting Information, section 7.2.5.10.), as reported by other authors.³⁵

Table 5. Furfural concentration in beer samples as a function of the storage time.

Storage days	49	187	284	627
[Furfural] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$205 \pm 13^*$	330 ± 14	366 ± 26	687 ± 46
% RSD	5%	3%	6%	5%

*($\pm \text{ts}/\sqrt{n}$, $n = 5$; 95%)

7.2.4. Conclusions

Thanks to the preparation of robust color-developing polymer disks and an Android-based app, furfural determination in beers can now be performed accurately in situ with a smartphone. The analyte selective method we have developed allows estimation of the freshness of beers stored for more than a year. Similar methods are

being developed to quantify other parameters of beer in order to guarantee the product quality to the customers.

7.2.5. Supporting information

7.2.5.1. Volatile aldehydes generated during beer aging

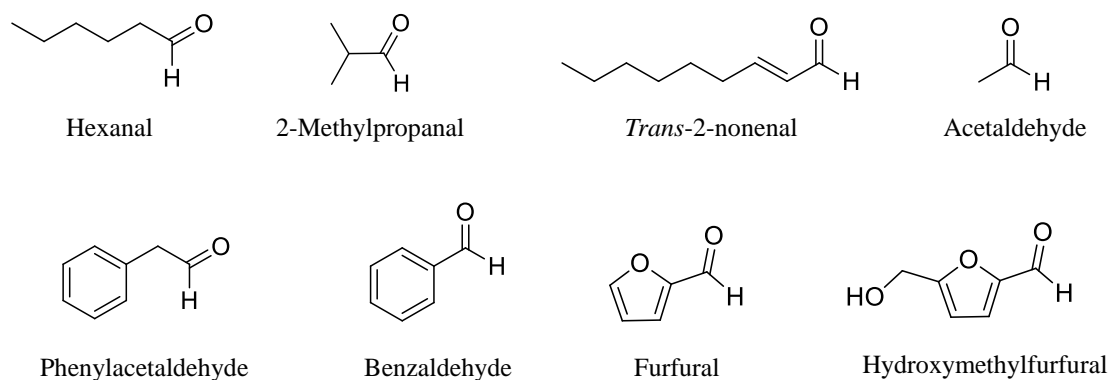
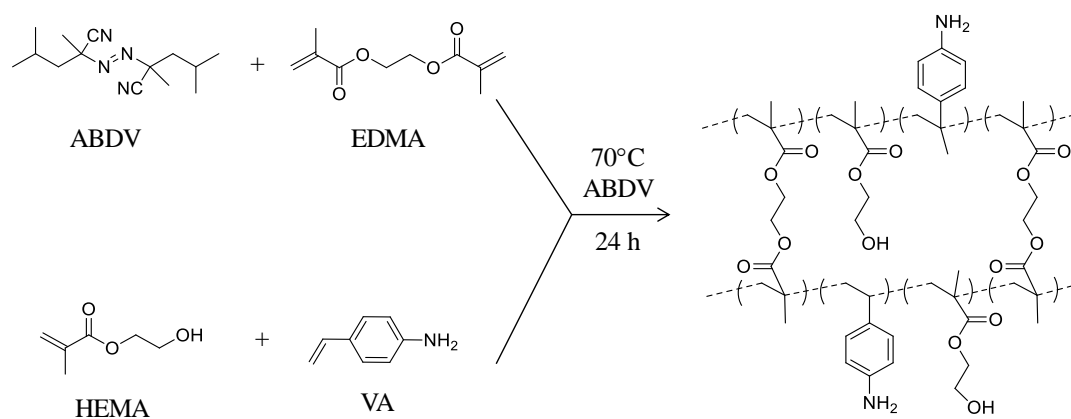


Figure 6. Typical volatile aldehydes produced during the beer ageing process.

7.2.5.2. Fabrication and optimization of membrane composition



Scheme 2. Scheme of the polymer synthesis.

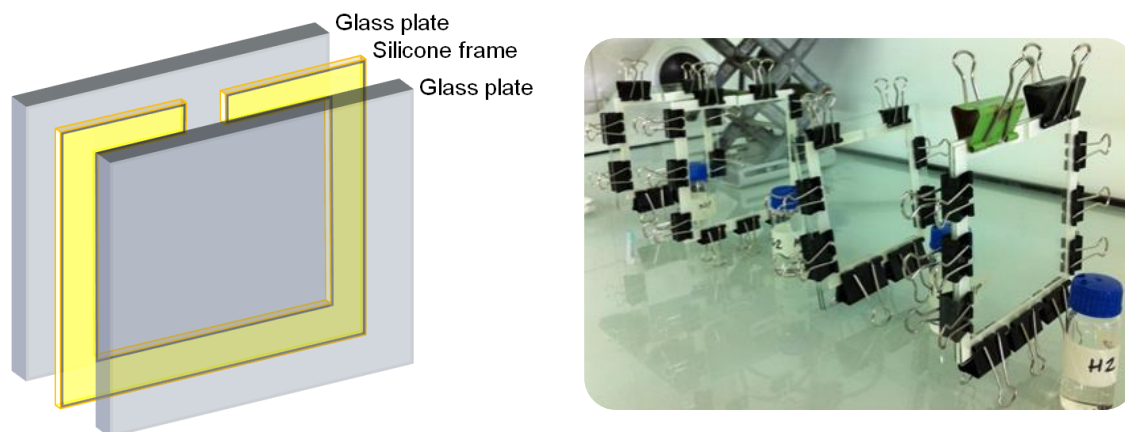


Figure 7. Scheme of the polymerization molds used for the films preparation. The glass slides (10×10 cm) were separated by a 0.9 mm thick silicone gasket (1 cm wide), compressed to create a leak-free seal and filled in with the prepolymerization mixture.

7.2.5.3. Synthesis of furfural-responsive polymer films

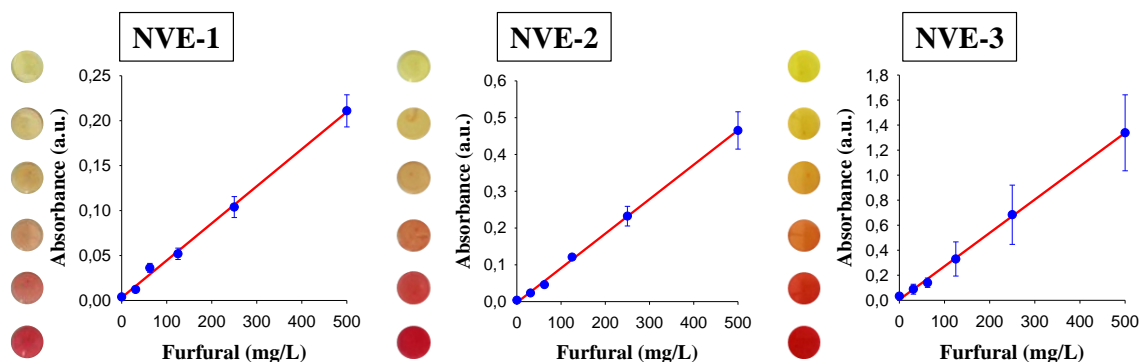


Figure 8. Representative calibration plots ($n = 3$) obtained with the sensor disks in 10 mL water/ethanol (80/20, v/v) solutions spiked with furfural at (●) 0, (●) 31, (●) 63, (●) 125, (●) 250 and (●) 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{abs}} = 537$ nm).

7.2.5.4. Effect of the membrane thickness on the sensor response

The effect of the film thickness on the homogeneity of the colorimetric sensor was evaluated by incubating 0.5- and 0.9-mm thick disks for 1 h in 10 mL samples of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ furfural in water-ethanol (80/20, v/v). As observed in Figure 9, the 0.9 cm-thick film showed an inhomogeneous response, likely due to the slower diffusion of the analyte through the thicker layer resulting in an incomplete reaction within the incubation time (1 h). This effect was not observed with the 0.5 cm-thick sensing discs that showed a uniform response throughout the surface and were selected for further experiments.

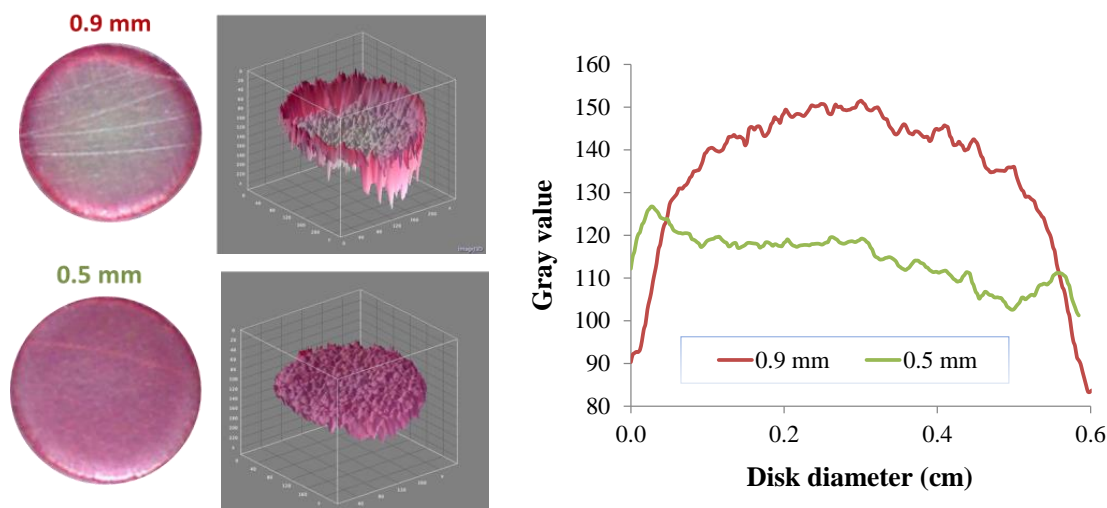


Figure 9. Effect of membrane thickness on the sensor response to $500 \mu\text{g L}^{-1}$ furfural in water-ethanol (80/20, v/v). Left, 3D image of the surface. Right, gray value variation along the disk diameter for a 0.9 and a 0.5 cm membrane thickness.

7.2.5.5. Effect of the acid catalyst concentration on the sensor response

The Stenhouse reaction between aniline and furfural takes place in acidic media. Therefore, the effect of the acid concentration in the measuring sample on the sensor response was studied by immersing the sensing disks in 10 mL samples containing $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of furfural in water-ethanol (80/20, v/v) spiked with HCl at different final concentrations (5, 29, 49 and 216 mM). All the experiments were done in triplicate. As observed in Figure 10, the sensitivity of the assay increased with the concentration of acid in the sample, reaching a maximum at 29 mM HCl.

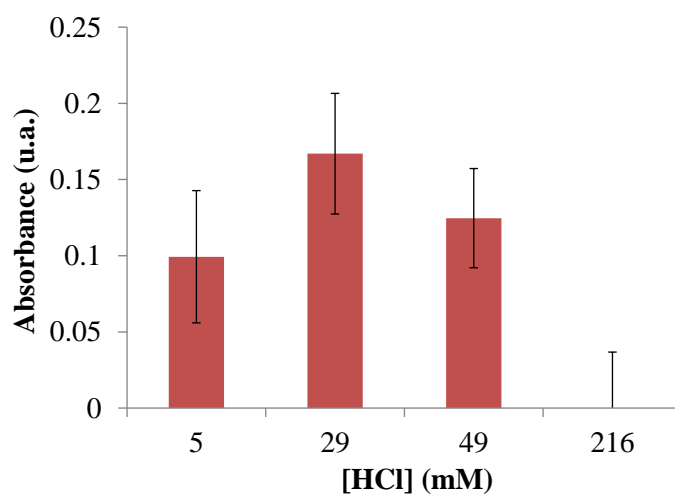
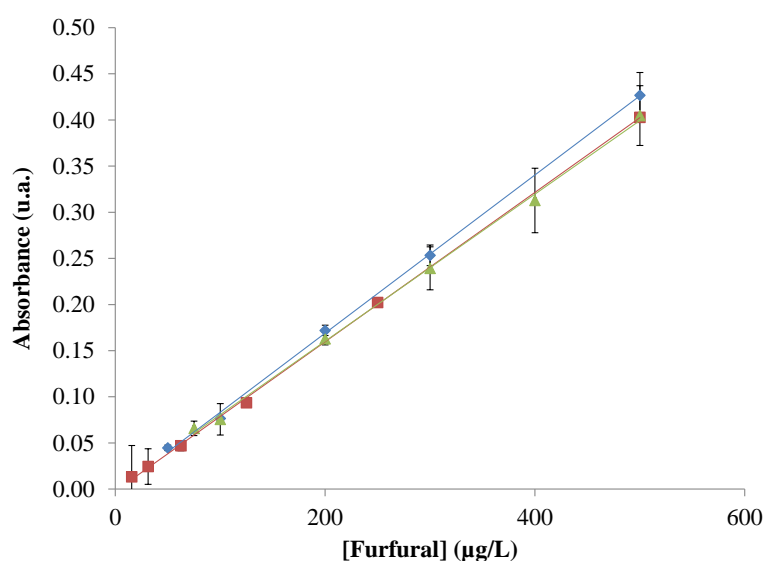


Figure 10. Effect of the HCl concentration in the sample on the sensor response. [Furfural] = $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$; $\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$).

Higher concentrations resulted in lower sensitivities and membrane damage as observed in 216 mM HCl. It has been described in the literature that swelling of polyHEMA hydrogels is higher in basic than in acidic medium,³⁶ which would explain the sensitivity lost at higher HCl concentrations. However, the Stenhouse reaction requires the presence of an acidic catalyst so that finally a 29 mM HCl concentration in the sample was selected for further assays.

7.2.5.6. Effect of the sample ethanol content on the sensor response



(◆) 0.0 % EtOH:	$A \text{ (a.u.)} = 858 (14) \times 10^{-6} [\text{Furfural}] + 30 (40) \times 10^{-4}$	$r = 0.9996$
(■) 5.4 % EtOH:	$A \text{ (a.u.)} = 810 (8) \times 10^{-6} [\text{Furfural}] + 22 (19) \times 10^{-4}$	$r = 0.9998$
(▲) 20 % EtOH:	$A \text{ (a.u.)} = 800 (20) \times 10^{-6} [\text{Furfural}] + 10 (50) \times 10^{-4}$	$r = 0.9992$

Figure 11. Effect of the ethanol concentration in the standard solutions of furfural (0 - 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) on the sensor response: (◆) 0.0 %, (■) 5.4 % y (▲) 20 % (v/v) ($n = 3$; $\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$). The values in parentheses indicate the standard deviations (SD).

7.2.5.7. Reproducibility of the disks fabrication

To investigate the reproducibility of the sensing film fabrication, three different batches were prepared in different months by independent operators. The sensors response to furfural standards (200 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) prepared in water-ethanol mixtures (94.6/5.4, v/v) are depicted in Figure 12. All the experiments were done in triplicate. No significant differences were observed (at a 95% confidence level) between the different batches ($\text{RSD} \leq 11\%$), demonstrating the reproducibility in the preparation of the sensing films.

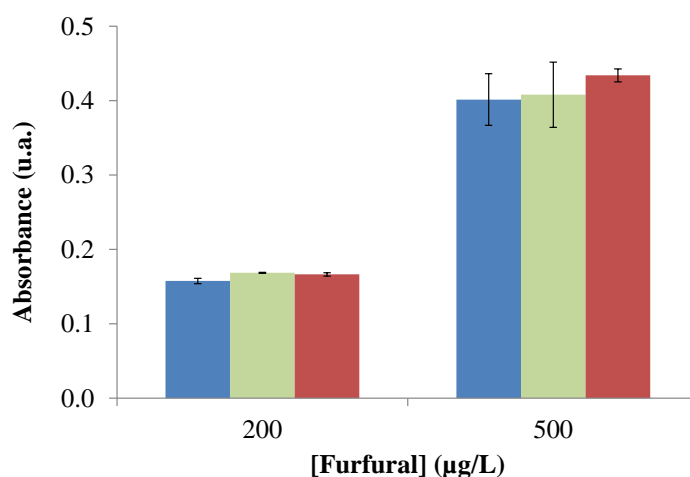


Figure 12. Evaluation of the reproducibility of the sensing film fabrication: (■) Month 1, (■) Month 3 and, (■) Month 4 ($n = 3$; $\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$). Incubation solvent: water-ethanol (94.6/5.4, v/v)

7.2.5.8. Sensor validation

The sensors were applied to the analysis of furfural in water-ethanol (94.6/5.4, v/v) samples spiked with furfural at six concentration levels (75 - 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) and the results have been validated by HPLC-DAD.

The results, collected in Table 6, showed no significant differences (confidence level 95%, $n = 3$) between both methods at any of the furfural concentration levels tested.

Table 6. Fiber-optic based sensor validation by HPLC-DAD ($n = 3$).

Spiking	[Furfural] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Found (Fiber-optic spectrophotometer)	Found (HPLC-DAD)
75	77 (10)	75 (1)
100	100 (20)	99.0 (0.1)
200	200 (6)	200 (2)
300	300 (23)	301.3 (0.4)
400	402 (16)	400 (2)
500	495 (40)	500 (2)

(SD) = Standard deviation

7.2.5.9. Evaluation of the matrix effects in real samples

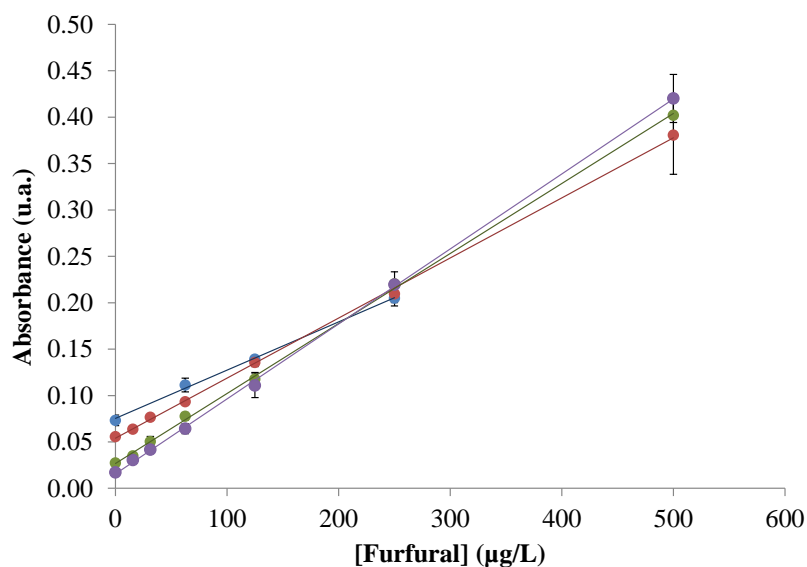


Figure 13. Evaluation of the matrix effect on the sensor response. Sample solutions: (●) water-ethanol (94.6/5.4, *v/v*), (●) beer, (●) beer diluted (1:1) with water-ethanol (94.6/5.4; *v/v*) and, (●) beer diluted (1:4) with water-ethanol (94.6/5.4, *v/v*). [Furfural]: 0 – 500 µg L⁻¹ (n = 5; λ_{abs} = 537 nm).

7.2.5.10. Linear correlation between storage time and furfural content

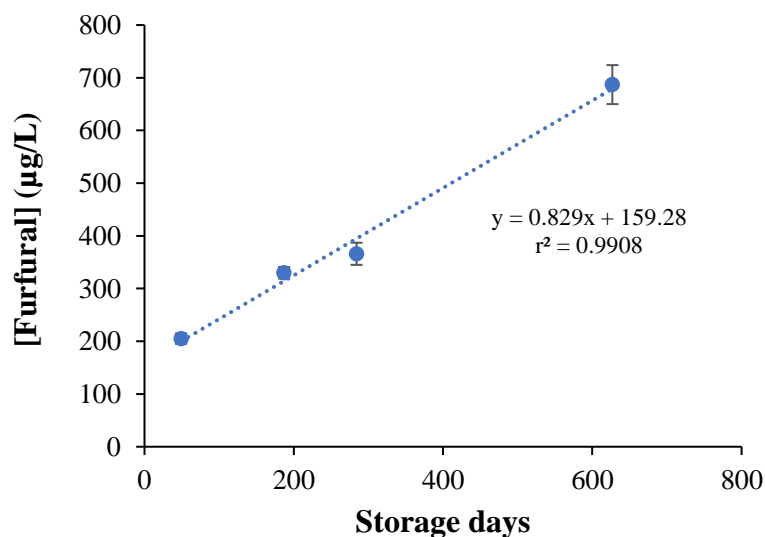


Figure 14. Correlation between the furfural concentrations in the beer samples, measured with the colorimetric sensors, and the days of storage. Linear correlation is confirmed by the r-value (0.995).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge L. Benet and J. L. Tartera from the Mahou-San Miguel Research Center (Spain) for providing the beer samples and for helpful discussions. This work has been funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, grants CTQ2012-37573-C02, CTQ2015-69278-C2-1-R, CTQ2015-69278-C2-2-R and IPT-060000-2010-14). Alberto Rico-Yuste thanks MINECO for a Predoctoral Research Grant.

References

1. M. Nelson, *The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe*, Taylor & Francis, New York, 1st edn., 2005.
2. J. E. Hodge, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1953, **1**, 928-943.
3. C. Delgado-Andrade, I. Seiquer, A. Haro, R. Castellano, M. P. Navarro, *Food Chemistry*, 2010, **122**, 145-153.
4. J. J. Baert, J. De Clippeleer, P. S. Hughes, L. De Cooman, G. Aerts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**, 11449-11472.
5. E. Teixidó, F. J. Santos, L. Puignou, M. T. Galceran, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1135**, 85-90.
6. G. Carrillo, A. Bravo, C. Zufall, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**, 4403-4411.
7. S. W. Tsai, K. Y. Kao, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2012, **92**, 76-84.
8. J. L. Chávez-Servín, A. I. Castellote, M. C. López-Sabater, *Journal of Chromatography A*, 2005, **1076**, 133-140.
9. E. Ferrer, A. Alegría, R. Farré, P. Abellán, F. Romero, *Food Chemistry*, 2005, **89**, 639-645.
10. D. Saison, D. P. De Schutter, F. Delvaux, F. R. Delvaux, *Journal of Chromatography A*, 2009, **1216**, 5061-5068.
11. F. Lo Coco, C. Valentini, V. Novelli, L. Ceccon, *Journal of Chromatography A*, 1996, **749**, 95-102.
12. F. Sosulski, R. M. Mahmoud, *Cereal Chemistry*, 1979, **56**, 533-536.
13. D. Muñoz Rodríguez, K. Wrobel, K. Wrobel, *European Food Research and Technology*, 2005, **221**, 798-802.
14. F. Lo Coco, V. Novelli, C. Valentini, L. Ceccon, *Journal of Chromatographic Science*, 1997, **35**, 578-583.
15. S. Malfliet, F. Van Opstaele, J. de Clippeleer, E. Syryn, K. Goiris, L. de Cooman, G. Aerts, *Journal of the Institute of Brewing*, 2008, **114**, 180-192.

16. B. Wang, E. V. Anslyn, *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, 2011.
17. A. García, M. M. Erenas, E. D. Marinetto, C. A. Abad, I. de Orbe-Paya, A. J. Palma, L. F. Capitán-Vallvey, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, **156**, 350-359.
18. F. Aeschlimann, P. O. Bethge, J. H. Eggers, *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 1958, **161**, 324-344.
19. R. Blue, D. G. Uttamchandani, O. Farish, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 1998, **47**, 964-966.
20. J. Stenhouse, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1870, **156**, 197-205.
21. W. M. Foley, G. E. Sanford, H. McKennis, *Journal of the American Chemical Society*, 1952, **74**, 5489-5491.
22. N. Cennamo, L. De Maria, G. Agostino, L. Zeni, M. Pesavento, *Sensors*, 2015, **15**, 8499.
23. *Official Journal of the European Union* 2011, European Commission Regulation (EC) N° 10/2011, pp. 12/1-12/89.
24. E. Benito-Peña, V. González-Vallejo, A. Rico-Yuste, L. Barbosa-Pereira, J. M. Cruz, A. Bilbao, C. Alvarez-Lorenzo, M. C. Moreno-Bondi, *Food Chemistry*, 2016, **190**, 487-494.
25. M.C. Moreno Bondi, M. E. Benito Peña, M. V. Gonzalez de Vallejo Rodríguez, A. Rico Yuste, J. Peña Bahamonde, B. Fité Luis, J. L. Tartera, Spanish patent P201430002, 2014.
26. D. G. Uttamchandani, R. G. Blue, U.S. Patent US 6235532 B1, 2001.
27. E. Oral, N. A. Peppas, *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)*, 2001, **42**, 111-112.
28. B. Dirion, Z. Cobb, E. Schillinger, L. I. Andersson, B. Sellergren, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 15101-15109.
29. *Official Journal of the European Union* 2011, European Commission Regulation (EC) N° 10/2011, pp. 12/1-12/132.
30. M. Polk, T. L. Vigo, A. Turbak, in *Encyclopedia of Polymer Science, Concise*, ed. H. F. Mark, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, 2013, pp. 557-563.
31. E. M. Ahmed, *Journal of Advanced Research*, 2015, **6**, 105-121.
32. A. K. Williams, J. T. Hupp, *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120**, 4366-4371.
33. N. Shinohara, T. Kajiware, M. Ohnishi, K. Kodama, Y. Yanagisawa, *Environmental Science & Technology*, 2008, **42**, 4472-4477.
34. (a) www.galladechem.com, (b) www.sakura-americas.com, (c) www.sciteck.org (accessed 11/12/2015)
35. B. Vanderhaegen, H. Neven, S. Coghe, K. J. Verstrepen, H. Verachtert, G. Derdelinckx, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 6782-6790.

36. M. L. Gómez, R. J. J. Williams, H. A. Montejano, C. M. Previtali, *Express Polymer Letters*, 2012, **6**, 189-197.

7.3. Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in foodstuffs by molecularly imprinted solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

En este artículo se describe la síntesis de un MIP selectivo a dos micotoxinas producidas por un hongo de la familia de la *Alternaria*, concretamente, alternariol y alternariol monometil éter, así como su aplicación al desarrollo de un método de análisis basado en una extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta resolución con detección de masas en tándem (MISPE-HPLC-MS/MS).

Se sintetizaron polímeros en formato de microesferas porosas, utilizando un molde sacrificable de sílice, partiendo de una composición optimizada previamente. En lugar de las micotoxinas se empleó una molécula plantilla análoga, (3,8,9-trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona), sintetizada en el grupo de investigación con el fin de reducir el coste de la preparación del MIP y los problemas de toxicidad derivados del uso de micotoxinas en su síntesis, así como evitar problemas de sangrado en el proceso MISPE. Tras optimizar las condiciones de extracción en fase sólida, para la limpieza y preconcentración de estos analitos, se procedió a la validación del método desarrollado empleando MISPE-UPLC-MS/MS para la determinación de las micotoxinas en muestras de zumo de tomate, concentrado de tomate y aceite de sésamo. Además, se compararon las características analíticas de los métodos MISPE optimizados empleando dos polímeros selectivos a estas micotoxinas, sintetizados con dos monómeros funcionales diferentes, a fin de seleccionar el más adecuado para la aplicación final.

Las etapas de las que consta este trabajo se pueden resumir en:

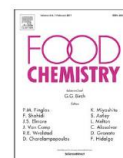
1. Síntesis de MIPs en formato de microesferas porosas.
2. Caracterización física y estructural de los MIPs sintetizados.
3. Determinación de la capacidad de carga y factor de impronta de los MIP/NIPs.
4. Optimización de las condiciones del procedimiento MISPE.
5. Evaluación de los MIPs sintetizados con diferentes composiciones.
6. Validación del método MISPE-UPLC-MS/MS.

7. Aplicación del método desarrollado al análisis de las micotoxinas seleccionadas en diversas matrices alimentarias.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in foodstuffs by molecularly imprinted solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry



A. Rico-Yuste^a, J. Walravens^b, J.L. Urraca^{a,c}, R.A.G. Abou-Hany^d, A.B. Descalzo^d, G. Orellana^d, M. Rychlik^e, S. De Saeger^{b,*}, M.C. Moreno-Bondí^{a,*}

^a Chemical Optosensors and Applied Photochemistry Group (GSOLFA), Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Laboratory of Food Analysis, Department of Bioanalysis, Ghent University, Ottergemsesteenweg 460, BE-9000 Ghent, Belgium

^c CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Avenida Complutense, s/n, ES-28040 Madrid, Spain

^d Chemical Optosensors and Applied Photochemistry Group (GSOLFA), Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^e Technische Universität München, Chair of Analytical Food Chemistry, Alte Akademie 10, DE-85354 Freising, Germany

Reproduced from:

Food Chemistry 2018, **243**, 357-364

Copyright © 2018, with permission from Elsevier

Abstract

Molecularly imprinted porous polymer microspheres selective to *Alternaria* mycotoxins, alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME), were synthesized and applied to the extraction of both mycotoxins in food samples. The polymer was prepared using 4-vinylpyridine (VIPY) and methacrylamide (MAM) as functional monomers, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker and 3,8,9-trihydroxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one (S2) as AOH surrogate template. A molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) method has been optimized for the selective isolation of the mycotoxins from aqueous samples coupled to HPLC with fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 258 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) or MS/MS analysis. The MISPE method was validated by UPLC – MS/MS for the determination of AOH and AME in tomato juice and sesame oil based on the European Commission Decision 2002/657/EC. Method performance was satisfactory with recoveries from 92.5% to 106.2% and limits of quantification within the 1.1–2.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ range in both samples.

7.3.1. Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungal organisms. Even though mycotoxins are only present in trace level concentrations, their accumulation in foodstuffs is a global problem, both affecting human and animal health and provoking economic consequences.¹ Due to their toxic effects, chronic (dietary) exposure implies risks for the human health. *Alternaria* species generate mycotoxins that are of significant toxicological importance. *Alternaria* toxins are relevant contaminants in cereals but they are also known to occur in oilseeds, tomato, apples, citrus fruits, olives and several other fruits and vegetables. In addition, *Alternaria* species are responsible for spoilage of these commodities during refrigerated transport and storage due to their growth even at low temperature.² The most important and most common mycotoxin-generating species in harvested fruits and vegetables is *Alternaria alternata*. Because of their soft epidermis, tomatoes have a high susceptibility to fungal infestation, especially by *Alternaria* species, and several countries have reported the occurrence of these mycotoxins in tomato products.³ From all the adverse effects of these mycotoxins, inhibition of cholinesterase enzymes, liver and kidney damage, teratogenic and foetotoxic characteristics, and the relevance to the etiology of human oesophageal cancer are highlighted.⁴ Alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), altenuene (ALT), altertoxin (ATX) I, II and III, and tenuazonic acid (TeA) have all been identified as food contaminants with a potential toxicological risk and are the best-known representatives of the *Alternaria* toxins (Figure 1).⁵

In spite of their adverse effects, there are currently no guideline limits set by regulatory authorities for *Alternaria* mycotoxins in foodstuffs. At the request of the European Commission (EC), the European Food Safety Authority (EFSA) assessed the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in food and feed.² In March 2013, the EC issued a mandate to provide standardized analytical methods for determination of these toxins.⁶ As the EC is considering the possible setting of maximum levels for certain *Alternaria* toxins in food, EFSA has recently been requested to carry out a novel human exposure assessment. Within this context, the EFSA recently launched a specific call for occurrence data on *Alternaria* toxins in food.⁷

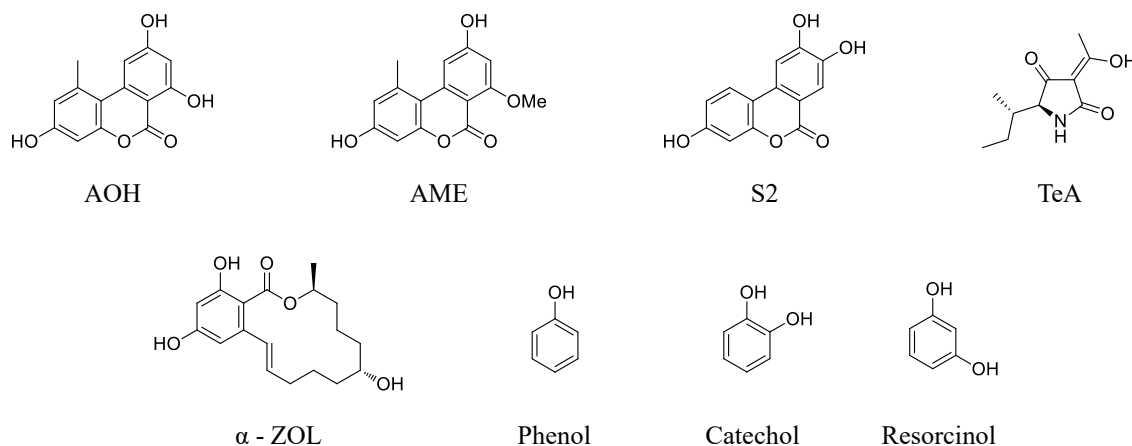


Figure 1. Molecular structures of alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME), 3,8,9-trihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one (S2), and of the compounds tested as interferents in cross reactivity studies: tenuazonic acid (TeA), α -zearalenol (α -ZOL), phenol, catechol and resorcinol.

Currently, analytical methods for determination of AOH and AME are based on liquid chromatography (LC) with diode array (DAD),⁸ fluorescence (FLD),⁹ or mass spectrometric (MS) detection^{10,11} preceded by sample clean-up usually based on solid-liquid extraction (SLE),¹² QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe),^{13,14} or solid-phase extraction (SPE)^{8,15} depending on the matrix. Recently, immunoassay based methods for the determination of AOH and AME have been reported.^{9,16} Drawbacks of using antibodies are high production costs, the need of animals and a low stability.

A good alternative for the clean-up step are molecularly imprinted polymers (MIPs). MIPs are synthetic materials containing specific binding sites with a shape, size and geometry of functional groups complementary to those present in the template molecule, mimicking antibodies and enzymes.¹⁷ Due to these special features, MIPs are a desirable option as SPE sorbents for sample clean-up, a procedure known as MISPE. Besides the clean-up capability, MIP cartridges can be reused many times without losing their recognition properties.¹⁸ Their application has increased significantly in the last few years^{19,20} but, to the best of our knowledge, so far there are very few methods for AOH and AME determination in foodstuffs using MISPE.²¹

The present paper describes the synthesis of novel MIP beads imprinted with an AOH surrogate template, 3,8,9-trihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one (S2), representing a cheaper non-toxic alternative to the target analytes. This compound, also known as urolithin C, is a gut microbiota metabolite derived from ellagic acid that can

be produced after the ingestion of pomegranate, tea, some berries and nuts.²² The MIP uses 4-vinylpyridine (VIPY) and methacrylamide (MAM) as functional monomers, and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker. Microspherical polymer particles were synthesized from porous silica beads (40–75 μm) as sacrificial scaffolds for polymerization.²³ A MISPE-UPLC-ESI-MS/MS methodology was optimized for the simultaneous determination of AOH and AME in tomato juice and sesame oil. The method was validated according to the European Commission Decision 2002/657/EC and the ICH guidelines.^{24,25} Finally, the MISPE procedure was compared with a traditional sample preparation methodology through the analysis of a number of commercially available food samples.

7.3.2. Materials and methods

7.3.2.1. Reagents and chemicals

Methacrylamide (MAM), 4-vinylpyridine (VIPY), ethylene glycoldimethacrylate (EDMA), alternariol monomethyl ether (AME), α -zearalenol (α -ZOL), catechol and resorcinol were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). *N*-(2-aminoethyl)methacrylamide (EAMA, as hydrochloride salt) was provided by Polysciences (Warrington, PA, USA). The initiator *N,N*-azo-bis-(2,4-dimethyl)valeronitrile (ABDV) was purchased from Wako (Neuss, Germany) and used as received. Alternariol (AOH) and tenuazonic acid (TeA) were supplied from Apollo Scientific (Bredbury, Cheshire, UK); phenol was from Mallinckrodt Pharmaceuticals (Hazelwood, MO, USA). Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) (HPLC-grade) were provided by SDS (Peypin, France) and trifluoroacetic acid (TFA) (HPLC-grade, 99%) was from Fluka (Buchs, Switzerland). MeOH and ACN (both LC-MS grade) and glacial acetic acid (ULC/MS) were purchased from BioSolve BV (Valkenswaard, The Netherlands), whereas MeOH, ACN and *n*-hexane (all HiPerSolv Chromanorm HPLC grade) were from VWR International (Zaventem, Belgium). Acetic acid (100%), ammonium acetate and ammonium carbonate were from Merck (Darmstadt, Germany). Acetone (99.5+%, for analysis) was from Acros Organics (Geel, Belgium). Disinfectol® (denaturated ethanol with 5% ether) was supplied from Chem-Lab NV (Zedelgem, Belgium). Water was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). The monomers

were purified, as required, by chromatography immediately before use using with an inhibitor-remover column from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). The isotopically labelled internal standards [$^2\text{H}_4$]-AOH and [$^2\text{H}_4$]-AME were synthesized and provided by the Chair of Analytical Food Chemistry (Technische Universität München (TUM), Freising, Germany).²⁶ The surrogate 3,8,9-trihydroxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one (S2) was synthesized as described by Orellana *et al.*²⁷. AOH and AME individual stock solutions were prepared in MeOH at a concentration of 200 mg L⁻¹ and the solutions stored at 4 °C.

7.3.2.2. Instrumentation

The pH of the aqueous solutions was adjusted with a pH-meter GLP 22 from Crison (Barcelona, Spain). The polymer samples were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL-6400 electron microscope working at 20 kV and a JEOL JSM 6355F Field Emission Gun (FEG) microscope operating at 5-10 kV. The samples for SEM were coated by sputtering with a thin gold film before observation.

7.3.2.3. HPLC-FLD methodology

The high performance liquid chromatographic system consisted of a HP-1100 series HPLC system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, on-line degasser, autosampler, automatic injector, column thermostat and fluorescence detector (FLD). Chromatographic separation of AOH and AME was carried out on an AQUATM C₁₈ (polar end-capped) column (5 µm, 250 × 4.6 mm) preceded by a C₁₈ guard column (5 µm, 4.0 × 3.0 mm), both from Phenomenex (Torrance, CA, USA). Column temperature was set at 35 °C. Chromatographic separation was performed using gradient elution, by combining solvent A (water with 0.01% TFA) and solvent B (MeOH), as follows: 55% B (8 min, 1 mL min⁻¹); 55–70% B (1 min, 1 mL min⁻¹); 70% B (2 min, 1 mL min⁻¹) and 70–55% B (5 min, 1 mL min⁻¹). Then, the initial conditions were maintained for 5 min at 1 mL min⁻¹ before the next injection. The injection volume was set to 8 µL. The fluorescence excitation/emission wavelengths were set at 258/440 nm. Quantification was performed using external calibration peak area measurements. Linear calibration graphs were obtained in a concentration range of 6–1000 µg L⁻¹ for AOH and AME ($R^2 > 0.9992$).

7.3.2.4. UPLC-MS/MS methodology

Analyses were performed on a Waters Acquity UPLC-Xevo TQ-S mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA), equipped with MassLynx and TargetLynx® v. 4.1. software (Micromass, Manchester, UK) for data acquisition and processing. Chromatographic separation was achieved with an Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm) column (Waters, Milford, MA, USA). Column and autosampler temperature were set at 35 °C and 10 °C, respectively. A mobile phase consisting of eluents A (water with 1% acetic acid) and B (ACN with 1% acetic acid) was used at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. A gradient elution was applied as follows: 95% mobile phase A for 0.5 min, followed by a linear increase from 31% to 40% mobile phase B between 0.6 and 4.25 min. An isocratic phase of 90% mobile phase B was initiated at 4.35 min and maintained for 0.85 min, after which column re-equilibration took place, resulting in a total run time of 7 min. The injection volume was set to 5 μL . In order to achieve optimal sensitivity and selectivity of the MS conditions, data acquisition was performed applying selected reaction monitoring (SRM) with an optimized dwell time of 0.05–0.16 s. For each target analyte, two precursors to product ion transitions were determined. In accordance with Commission Decision 2002/657/EC, laying down the performance criteria of analytical methods, the use of two transitions allows determination of the ratio between these two transitions (relative ion intensity). This ratio, together with the relative retention time and signal-to-noise ratio (S/N), allows the confirmation of the identity of the detected compound.²⁵ MS/MS instrumental parameters were optimized via direct infusion (flow rate of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$) of a tune solution (1 ng μL^{-1}) of each analyte, dissolved in MeOH/ultrapure water (50/50 v/v, 0.1% formic acid). The ESI source was operated in negative ionization mode at the following working conditions: capillary voltage 2.95 kV, ion source and desolvation temperatures of 150 and 600 °C, respectively, desolvation and nebulizer gas flow rates of 1200 and 150 L h⁻¹, respectively, collision gas flow of 0.14 mL min⁻¹ and argon pressure in the collision cell 4.0×10^{-3} mbar. The following transitions were monitored in SRM mode (in parentheses, cone voltage (V) and collision energy (eV)): alternariol: m/z 257.1 \rightarrow 213.1 ([M-H-CO₂]⁻; -75 V, -22 eV) and m/z 257.1 \rightarrow 215.1 ([M-H-C₂H₂O]⁻; -75 V, -25 eV); [²H₄]-alternariol: m/z 261.3 \rightarrow 150.3 (-75 V, -46 eV) and m/z 261.3 \rightarrow 217.3 (-75 V, -32 eV); alternariol methyl ether: m/z 271.2

→ 256.2 ([M-H-CH₃]; -60 V, -21 eV) and m/z 271.2 → 228.2 ([M-H-CH₃-CO]; -60 V, -28 eV); [²H₄]-alternariol methyl ether: m/z 275.2 → 260.2 (-60 V, -20 eV) and m/z 275.2 → 232.1 (-60 V, -27 eV).

7.3.2.5. Molecularly Imprinted Polymers synthesis

For the synthesis of P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA) (polymer 1), the template molecule (S2, 0.12 mmol) was mixed with 0.23 mmol of each functional monomer (VIPY and MAM), dissolved in 240 µL of ACN, and 2.5 mmol of the cross-linker (EDMA) and the initiator (ABDV) (7% by weight of the final mixture). Then, the cocktail solution was transferred to a 27 mL glass vial solution containing 1.3 g of silica (Si-500, 40–75 µm, Silicycle) and mixed by stirring until the silica beads were freely flowing.²³ The vial was sealed with a septum and purged with N₂ for 5 min. The mixture was left to polymerize 24 h at 60 °C. The resulting composite was shaken for 24 h with an aqueous solution (3 × 140 mL) of 3 mol L⁻¹ NH₄HF₂. The polymer particles were washed with water (until pH ~7), MeOH/TFA (99:1, v/v) (50 mL) and MeOH (250 mL) followed by vacuum oven drying at 50 °C for 24 h. Before packing into the SPE cartridges, the beads were sedimented using MeOH/water (80:20, v/v) in order to remove fine particles. Non-imprinted polymers (NIPs) were prepared in the same way, but without adding the template to the monomer mixture.

P(EAMA-*co*-MAM-*co*-EDMA), polymer 2, used for the comparison with polymer 1, was synthesized as described in Abou-Hany *et al.*²¹ using EAMA as functional monomer instead of VIPY.

7.3.2.6. Foodstuffs: sample clean-up and preconcentration using MISPE cartridges

Tomato juice samples were subjected to lyophilisation (Telstar Lyobeta 25, Terrassa, Spain) prior to analysis, whereas sesame oil was used without any pretreatment. Lyophilised tomato samples (0.5000 g ± 0.0025 g) and sesame oil samples (2.0000 g ± 0.0025 g) were spiked with the labelled internal standards ([²H₄]-AOH and [²H₄]-AME) at concentrations of 25 µg kg⁻¹ and 20 µg kg⁻¹, respectively. Prior to extraction, 5 and 10 mL of ultra-pure water was added to the lyophilised tomato juice

and sesame oil samples, respectively, followed by vortex-mixing and soaking for 15 min. All samples were extracted for 30 min with 10 mL of ACN using an Agitelec overhead shaker (J. Toulemonde & Cie, Paris, France). Sample extracts were briefly centrifuged (1 min, $3200 \times g$) and pre-weighed Na_2SO_4 anhydrous salt (tomato juice: 2.00 ± 0.05 g; sesame oil: 4.00 ± 0.05 g) was added. After shaking for 15 min and centrifuging (10 min, $3200 \times g$), an aliquot of the upper layer (sesame oil: 4 mL; tomato juice: 8 mL) was evaporated to dryness using a Turbovap LV module (Biotage AB, Uppsala, Sweden) maintained at 40°C . Then, the residue was re-dissolved in 10 mL of phosphate buffer (50 mmol L^{-1} , pH 8.2) and 100 μL of MeOH, to prevent analyte precipitation, and filtered using a SPE frit to avoid solid residues. After conditioning of the MISPE cartridges, the filtrate was loaded, followed by washing, elution and re-equilibration, as described in Section 7.3.5.1. in the Supplementary data. Finally, the eluent was collected and evaporated to dryness using the Turbovap module. The residue was re-dissolved in 100 μL of injection solvent, consisting of mobile phase A and mobile phase B (70/30, v/v), vigorously vortex-mixed and subjected to centrifugation (Ultrafree[®]-MC centrifugal device; Millipore, Bedford, MA, USA) for 10 min at $10,000 \times g$ prior to LC-MS/MS analysis.

7.3.2.7. Mycotoxin extraction using QuEChERS

To evaluate the implementation of the developed MIP as an SPE sorbent, the concentration of AOH and AME present in contaminated tomato juice and sesame oil samples was determined using QuEChERS. This method was previously developed and validated for the determination of *Alternaria* toxins in tomato products²⁸ and vegetable oils.²⁹

7.3.2.8. MISPE-UPLC-MS/MS method validation

Due to the unavailability of certified reference material, the MISPE-UPLC-MS/MS methods were validated using spiked blank (lyophilised in case of tomato juice) samples. Compliance with criteria mentioned in Commission Decision 2002/657/EC were assessed for the following validation parameters: specificity, linearity, apparent recovery, repeatability (intraday precision; RSD_r), reproducibility (intermediate precision; RSD_R) and expanded measurement uncertainty (U).²⁵ The limit of detection

(LOD) and limit of quantification (LOQ) were assessed according to the ICH guidelines.²⁴ All validation parameters were calculated using the response (relative peak area), which is calculated as the ratio of the peak area of the analyte to the peak area of the internal standards [²H₄]-AOH (for AOH) and [²H₄]-AME (for AME). A detailed description of the procedure followed for method validation is included in Section 7.3.5.2. in the Supplementary data.

7.3.3. Results and discussion

7.3.3.1. Synthesis of the imprinted polymers

The use of surrogates of the target analyte for the MIP synthesis is a well known practice to avoid problems related to the high cost, limited availability or toxicity of the target molecules.^{21,30,31} Furthermore, it prevents false positives in the analysis of foodstuff using MISPE. In this work, we selected S2 (Figure 1) as the template molecule for the MIP preparation, as previous experiments demonstrated its good performance as AOH mimic.^{21,27} The polymers were prepared by free radical polymerization via thermal initiation with ABDV with VIPY and MAM as functional monomers and EDMA as cross-linker. Template:VIPY:MAM:cross-linker molar ratio was set to 1:2:2:20.²¹

Micrometer-sized spherical MIP particles were prepared using silica beads as sacrificial scaffolds. The use of these materials avoids several drawbacks linked to the application of bulk polymers in solid phase extraction, such as losses of material, partial destruction of the binding sites during polymer grinding and sieving, or limited accessibility of the target molecules to the binding sites inside the matrix network.³²

Figure 2A and B shows the SEM micrographs of the MIP and NIP beads, respectively, after silica etching. It can be observed that polymer porosity is strongly affected by the characteristics of the silica particles used as scaffolds during polymerization.

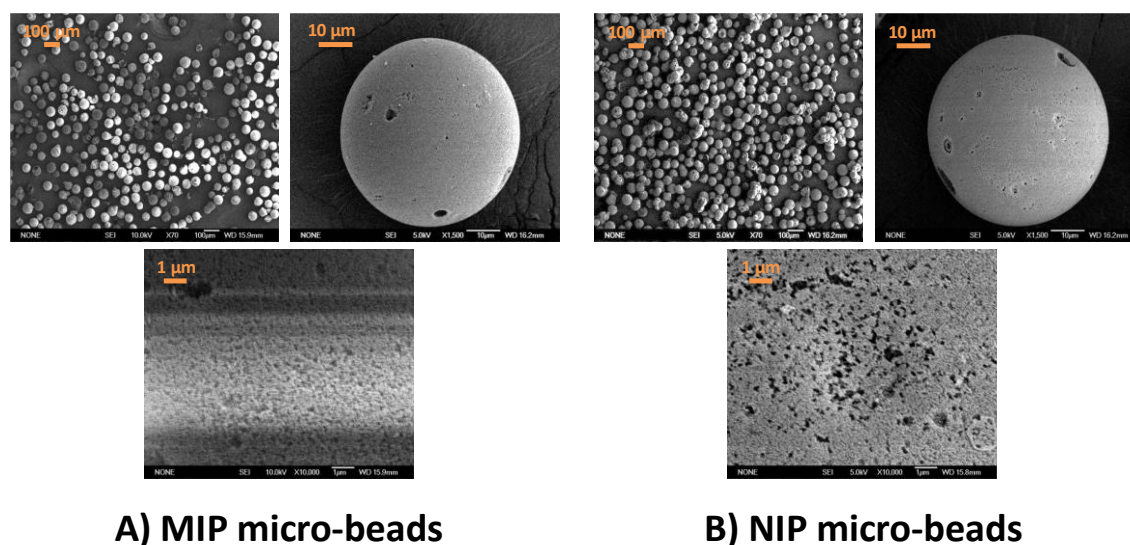


Figure 2. Scanning electron micrographs of the MIP (A) and the NIP (B) microbeads at various magnification levels.

7.3.3.2. Optimization of the MISPE protocol

Several factors influencing the MISPE method have been evaluated including composition of the washing solvent and cross-reactivity. Determination of the breakthrough volume (*i.e.*, maximum sample volume that can be loaded with quantitative recovery of analyte) is reported in the Supplementary data (Section 7.3.5.3.).

Selection of washing solvent

Specific interactions between AOH and the binding sites in the MIP can be maximized using ACN/water mixtures in the washing step.^{19,20} To evaluate this effect, the cartridges were loaded with 5 mL of AOH (1 mg L⁻¹) in phosphate buffer (50 mmol L⁻¹, pH = 8.2), washed with 3 mL of ACN/water mixtures (ACN 0 to 100%, v/v), and the mycotoxin was eluted with 1 mL of 1% TFA in MeOH before analysis by HPLC-FLD. The results are summarized in Figure 4 (Supplementary data, Section 7.3.5.3.). Retention of AOH in the MIP, as well as in the NIP, was higher at lower ACN concentrations in the washing solvent. Moreover, recoveries from the MIP were always higher than from the NIP for ACN/water concentrations lower than 50% (v/v). The use of 3 mL ACN/water (20:80, v/v) significantly decreased the non-specific interactions of AOH in the imprinted polymer, with recoveries of 78% (RSD 0%, *n* = 3) and 18% (RSD 6%, *n* = 3) in the MIP and the NIP, respectively. The use of an ACN/water mixture (15:85 v/v)

improved recoveries from the MIP (93%, RSD 1%, $n = 3$), at the expense of increasing the non-specific interactions in the NIP (43%, RSD 6%, $n = 3$). Finally, a combination of a washing step with 2 mL of ACN/water (5:95, v/v), followed by 3 mL of ACN/water (15:85, v/v), was selected for further experiments as it did not affect significantly the extraction recoveries of AOH and AME in the MIP (data not shown) but proved to be very efficient for removing matrix interferences in foodstuff analysis. The optimized MISPE method for the analysis of aqueous samples is described in the Supplementary data (Section 7.3.5.1.).

Cross selectivity

The selectivity of the MISPE method was evaluated by comparing the recoveries of several compounds with similar structures to AOH, both in the MIP and in the NIP, under the optimized MISPE conditions. The cartridges were loaded with 25 mL solutions containing 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of AOH, AME, α -ZOL, TeA, S2, phenol, catechol or resorcinol in phosphate buffer (50 mmol L^{-1} , pH = 8.2).

As shown in Figure 3, the imprinted polymer possesses a strong affinity for AOH and AME (99 and 97%, respectively), and slightly lower for the S2 template (71%), under the optimized MISPE conditions. Retention in the NIP was as low as 50% and 11% for AOH and S2, respectively, due to the lack of specific binding sites, although some retention was observed mostly because of hydrophobic interactions with the polymer matrix (see below). On the contrary, AME also displays high affinity for the NIP (92%). This behavior can be explained by considering that the analyte hydrophobicity (measured as log P) is higher for AME (log $P = 3.9$) than for AOH (log $P = 2.7$).²¹ Likewise, α -ZOL, containing also the resorcylate ester moiety of AME and a log P of 4.2, was also retained by both MIP (101%) and NIP (77%). TeA (log $P = 3.9$),³³ phenol (log $P = 0.8$), catechol (log $P = 0.7$) and resorcinol (log $P = 1.5$)²¹ were neither retained in the MIP nor the NIP, supporting the assumption that the imprinted polymer only recognizes those analytes with the right functional group distribution and spatial fit for the binding cavities.

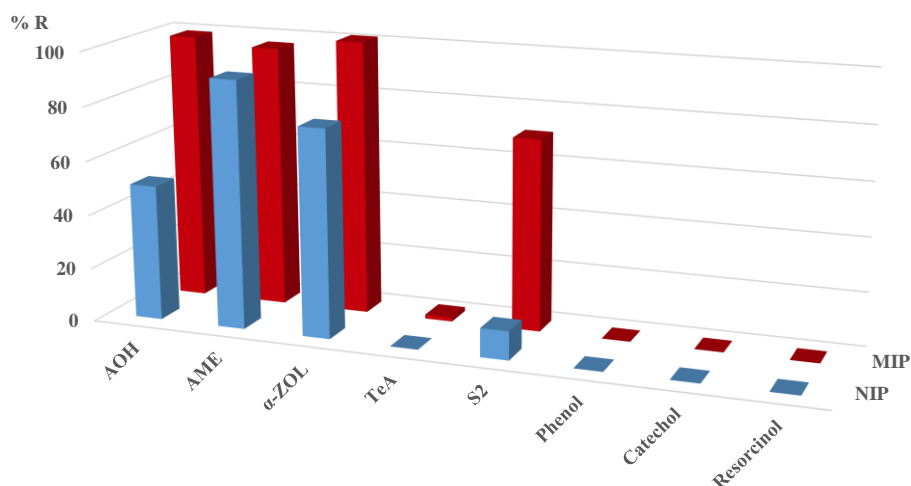


Figure 3. Extraction recovery (%) of AOH, AME, α -ZOL, TeA, S2, phenol, catechol and resorcinol from samples ($V = 25$ mL in phosphate buffer 50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 8.2$) spiked at $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ with each of the tested compounds ($\text{RSD} \leq 8\%$, $n = 3$).

7.3.3.3. Determination of the binding site distribution and affinities

The binding properties and homogeneity of the binding sites in the imprinted P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA) polymer were assessed in equilibrium binding experiments as described in the Supplementary data (Section 7.3.5.4.). The values for the total number of binding sites (\bar{N}_{MIP} : $30 \pm 4 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$, \bar{N}_{NIP} : $24 \pm 3 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) and the affinity constants (\bar{K}_{MIP} : $120 \pm 10 \text{ (mmol L}^{-1})^{-1}$, \bar{K}_{NIP} : $68 \pm 5 \text{ } 10 \text{ (mmol L}^{-1})^{-1}$) are significantly higher for the MIP than for the NIP in the studied concentration range (Figure 6 and Table 5, Supplementary data, Section 7.3.5.4.). A comparison of the heterogeneity parameter (m) reveals that it is similar in the MIP (0.67 ± 0.02) and the NIP (0.67 ± 0.03). This behavior can be attributed to the presence of the silica scaffold during polymerization, as it contributes to a higher extent to the heterogeneity of the imprinted polymer than the template molecule.³⁴ The apparent number of binding sites, $\bar{N}_{\text{K1-K2}}$, and the apparent weighted average affinity, $\bar{K}_{\text{K1-K2}}$, of the MIP described in this work compared to those reported previously for a polymer prepared using S2 as template molecule, (*N*-(2-aminoethyl)methacrylamide (EAMA) as functional monomer and EDMA as cross-linker²¹ did not differ significantly (95% confidence level).

7.3.3.4. Comparison of the performance of different S2-imprinted MIPs for the analysis of AOH and AME in food matrices

The MISPE method was applied to the analysis of AOH and AME in tomato juice, tomato concentrate and sesame oil in combination with UPLC-ESI-MS/MS. In parallel, the same analyses were carried out using the S2-imprinted P(EAMA-*co*-MAM-*co*-EDMA) polymers previously reported²¹ in order to investigate which recognition material was more effective for the analysis of those mycotoxins in the selected food matrices.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined using MMC curves, by spiking blank samples at 8 concentrations levels (0.05–25 $\mu\text{g kg}^{-1}$) for each investigated matrix. Additionally, the decision limit (CC_α) and detection capability (CC_β) were also calculated. According to EU Commission Decision 2002/657/EC for those substances which do not have MRLs yet, the CC_α is defined as “the lowest concentration level at which a method can establish, with an error probability of 1%, that a particular analyte is present in a sample”. By contrast, the CC_β is “the lowest concentration at which a method is able to detect truly contaminated samples with an error probability of 5%”.²⁵ In other words, CC_α is a parameter used to prevent false positive results, whereas CC_β should prevent false negative results. Although no regulatory limits have been set for *Alternaria* toxins in foodstuffs, the developed MISPE procedure in combination with a UPLC-MS/MS methodology allowed the determination of AOH and AME at the low parts per billion ($\mu\text{g kg}^{-1}$) level.

Table 1 collects the LOD and LOQ values for both mycotoxins in each investigated food matrix, after sample clean-up and preconcentration using the two different MIPs. In the case of polymer 1, prepared with VIPY as functional monomer, the LOQs ranged from 0.63 to 2.77 $\mu\text{g kg}^{-1}$, with lower values for tomato products than for sesame oil. However, the LOQs obtained with polymer 2, synthesized with EAMA, were two to three-fold higher than those measured with polymer 1. The reason for this behavior could be the slightly higher loading capacity of polymer 1 in comparison to polymer 2, although its selectivity is worse.²¹ The calculated LODs and LOQs for both analytes in each of the investigated matrices, were also verified by the resulting S/N

ratio, which should be equal to 3 and 10, respectively, according to IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) recommendations. Similar results can be observed in the case of $CC\alpha$ and $CC\beta$. Based on these results, polymer 1 was selected for further measurements.

Table 1. Ranges and adjusted squared correlation coefficient, R^2 , values of the matrix-matched calibration curves in tomato juice, tomato concentrate and sesame oil. Limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), decision limits ($CC\alpha$) and detection capabilities ($CC\beta$) for AOH and AME ($\mu\text{g kg}^{-1}$) were determined by using two different MIPs in the MISPE process.

		P(VIPY- <i>co</i> -MAM- <i>co</i> -EDMA)		P(EAMA- <i>co</i> -MAM- <i>co</i> -EDMA)	
		AOH	AME	AOH	AME
Tomato juice	Range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.05 - 25	0.05 - 25	0.5 - 25	0.05 - 25
	R^2	0.998	0.998	0.991	0.995
	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.58	0.63	1.78	0.91
	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1.16	1.27	3.56	1.82
	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.32	0.63	0.97	0.5
	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.41	0.47	1.33	1.24
Tomato concentrate	Range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.05 - 25	0.05 - 25	0.5 - 25	0.05 - 25
	R^2	0.999	0.999	0.995	0.987
	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.52	0.31	2.34	2.08
	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1.03	0.63	4.67	4.16
	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.28	0.31	1.28	1.14
	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.40	0.24	1.99	2.78
Sesame oil	Range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.05 - 25	0.05 - 25	0.05 - 25	0.05 - 25
	R^2	0.991	0.987	0.984	0.992
	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1.26	1.38	1.83	1.4
	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	2.52	2.77	3.67	2.8
	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.69	0.76	1	0.77
	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.92	1.67	3.18	0.95

7.3.3.5. Validation of the MISPE-UPLC-MS/MS methodology on food matrices

Specificity refers to the ability of an analytical method to discriminate between the target determined and other substances in the sample.²⁵ The specificity of the optimized methodology was confirmed by analyzing 20 representative blank samples

per matrix. The results showed the absence of interfering peaks ($S/N \geq 3$), within 2.5% of the relative retention times (RRTs), for both AOH and AME.

As described in the Supplementary data (Section 7.3.5.2.), in addition to the ordinarily reported regression coefficients (R^2) (Table 1), the linearity of the calibration plots was assessed upon applying a lack-of-fit test. Good linearity was obtained for both toxins in the evaluated range, with p -values greater than 0.05. The homogeneity of variance, known as homoscedasticity, was evaluated after.³⁵ A weighted least squares linear regression (WLSLR; weighting factor $[w_i] = 1/x^2$) analysis provided the best approximation of variance and improved the accuracy for both mycotoxins determination in each of the investigated matrices, particularly at the lower concentration levels of the calibration plot. The apparent recovery (R_A), repeatability (RSD_r), intermediate precision (RSD_R), and the expanded measurement uncertainty (U) values for AOH and AME in the studied matrices are collected in Table 2.

Table 2. Repeatability (RSD_r), intermediate precision (RSD_R), apparent recovery (R_A , %) and expanded measurement uncertainty (U , %) values for AOH and AME in tomato juice and sesame oil.

		AOH				AME			
		($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	R _A (%)	U (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	R _A (%)
Tomato juice	50	19.6	19.6	101.2	58.9	10.9	10.9	97.6	29.5
	100	18.0	18.0	99.8	49.3	8.9	8.9	102.9	24.9
	250	14.6	14.6	100.7	39.4	10.7	12.0	106.2	35.8
	500	13.5	13.5	98.5	36.9	13.4	13.4	102.9	36.6
	1000	7.8	8.1	102.6	24.8	15.7	16.2	92.5	45.8
Sesame oil	5	5.5	5.5	100.7	15.3	17.1	17.1	102.9	46.6
	10	13.6	13.6	99.5	37.0	14.3	14.3	94.4	38.9
	25	10.7	10.7	101.1	30.1	5.7	6.7	98.9	19.1
	50	15.6	15.6	99.8	42.3	8.1	8.1	99.4	23.2
	100	10.4	10.6	101.6	30.5	7.7	8.9	105.0	27.2

R_A ranged from 92.5 to 106.2% and from 94.4 to 105.0% for both analytes in tomato juice and sesame oil, respectively. These results are in good agreement with the guideline ranges (80–110%) set by the EC.²⁵ The RSD_r and RSD_R were calculated using a 1-way ANOVA and varied from 5.5 to 19.6% for both mycotoxins in the two matrices. According to the Commission Decision 2002/657/EC, the RSD_r and RSD_R values for repeated analyses of fortified material, under repeatable and reproducible conditions, should not exceed the figures calculated from the Horwitz equation (*i.e.*: $RSD_r = \frac{2}{3}(2^{[1 - 0.5 \log C]})$; $RSD_R = 2^{[1 - 0.5 \log C]}$). However, application of the latter equation results in unacceptable high values for analyte concentrations lower than 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.²⁵ Therefore we have utilized an in-house standard operating procedure for the analytical method validation, using RSD_r and RSD_R values of 20 and 25%, respectively.²⁸ In this way, U ranged from 24.8 to 58.9% and from 15.3 to 46.6% in tomato juice and sesame oil matrices, respectively, for AOH and AME. These results clearly demonstrate the capability of the imprinted polymer for cleaning-up of both tomato juice and sesame oil samples contaminated with those *Alternaria* toxins.

The calculated LOD and LOQ values (section 7.3.3.4) confirm that the developed MIP is an appropriate sorbent for the preconcentration and quantification of low levels of AOH and AME in tomato juice and sesame oil.

The optimized MISPE method furnishes cleaner (colourless) extracts than other commercially available sorbents (extracts still coloured), together with LODs and LOQs similar to or lower than current alternatives (

Table , Supplementary data, Section 7.3.5.). Furthermore, unlike commercial options, the MIP cartridges could be reused more than 30 times without losing their recognition properties.

7.3.3.6. Application of the MISPE-LC-MS/MS method to the analysis of food samples

To justify those statements, commercially available tomato juice ($n = 3$) and sesame oil ($n = 3$) samples, naturally contaminated with *Alternaria* toxins, were analyzed with the validated MISPE-UPLC-MS/MS methods. UPLC-MS/MS chromatograms of a naturally contaminated tomato juice and sesame seed sample showing co-occurrence of

AOH and AME is shown in Figure 7 and Figure 8 (Supplementary data, Section 7.3.5.5.). The analytical results were statistically compared by a one-way ANOVA to the results obtained by previously validated methodologies using QuEChERS (Section 7.3.2.7.).^{28,29} The results are shown in Table 3 and, with the exception of AME in samples 1S and 3T, no significant differences between the MISPE results and the outcome of the classic analyses were observed. These findings confirm that implementation of molecularly imprinted polymers during the clean-up step is a good alternative for the determination of *Alternaria* toxins (AOH and AME) in tomato juice and sesame oil matrices, enabling the detection of these toxins at $\mu\text{g kg}^{-1}$ concentration levels.

Table 3. Concentration ($\bar{x} \pm U$, $\mu\text{g kg}^{-1}$) of AOH and AME found in commercially available food samples using MISPE or traditional sample clean-up. In case of tomato juice, analytical results are expressed on lyophilised tomato juice matrix. To obtain the corresponding $\mu\text{g kg}^{-1}$ values for fresh (wet) weight of tomato juice, values need to be multiplied by a conversion factor (CF=0.052) based on the dry weight percentage of the matrix.

		AOH				AME			
		MISPE		Classic		MISPE		Classic	
	Sample	Conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)
Tomato juice	1T	85 ± 41	8	90 ± 28	15	< LOQ	n.a.	< LOQ	n.a.
	2T	258 ± 101	2	336 ± 89	12	45 ± 13	1	55 ± 11	7
	3T	87 ± 43	6	101 ± 31	9	9.2 ± 2.7	24	15 ± 3	18
Sesame oil	1S	6.9 ± 1.1	9	5.2 ± 1.8	19	103 ± 28	3	81 ± 21	13
	2S	5.7 ± 0.9	5	3.9 ± 1.3	28	47 ± 11	1	45 ± 11	5
	3S	< LOQ	n.a.	< LOQ	n.a.	4.9 ± 2.3	14	5.9 ± 1.7	13

n.a. = not applicable.

7.3.4. Conclusion

Molecularly imprinted porous microparticles were successfully obtained for selective binding of AOH and AME. Preparation of the MIPs is simple and reproducible, and the use of a surrogate of AOH as the template for the polymer synthesis prevents the problems associated with the low availability of the target molecule, allowing affordable access to unlimited amounts of the recognition materials. Moreover, the surrogate avoids leaching of the target analytes during the analyses, which might cause false positives. The optimized MISPE method allows selective extraction of AOH and

AME, but not of other compounds or mycotoxins. The combined method based on MISPE-UPLC-MS/MS has been successfully validated according to the criteria stipulated in Commission Decision 2002/657/EC. The method has been applied to the analysis of commercial food samples with results comparable to other reported methods, demonstrating the feasibility of using these reusable molecular recognition polymers instead of classic sample preparation methodologies.

7.3.5. Supplementary data

7.2.5.1. Aqueous samples: sample clean-up and preconcentration using MISPE cartridges

Solid-phase extraction cartridges (1 mL, Varian, Palo Alto, CA, USA), were packed with 25 mg of MIP, or the corresponding NIP. The cartridges were equilibrated with 10 mL of MeOH and 10 mL of phosphate buffer (50 mmol L⁻¹, pH = 8.2). The mycotoxins mixture (25 mL), dissolved in phosphate buffer (50 mmol L⁻¹, pH = 8.2), was percolated at a constant flow rate of 0.6 mL min⁻¹ with the aid of an 8-channel Ismatec ISM936D peristaltic pump (Oak Harbor, WA, US). The cartridges were rinsed with 2 mL of ACN/water (5:95, v/v) and 3 mL of ACN/water (15:85, v/v), to remove the non-specifically retained compounds. Finally, the mycotoxins were eluted with 1% TFA in MeOH and the cartridges were equilibrated with 5 mL of MeOH and 5 mL of phosphate buffer (50 mmol L⁻¹, pH = 8.5) before a new application. The eluates from the MISPE column were directly injected into the HPLC system for analysis. All the analyses were performed in triplicate. The MISPE method applied with polymer 2 has been optimized elsewhere.²¹

7.3.5.2. MISPE-UPLC-MS/MS method validation

Specificity, linearity, LOD, LOQ, CC_α and CC_β.

The specificity of the proposed methodologies was evaluated by the analysis of twenty representative blank tomato juice and sesame oil samples.

Linearity was evaluated using matrix matched calibration (MMC) curves (in triplicate), by spiking representative blank samples at five concentration levels (50, 100,

250, 500 and 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in case of tomato juice, and 5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in case of sesame oil). In addition to the commonly reported regression coefficient (R^2), a lack-of-fit test (IBM SPSS 21) was also performed to assess the adequacy of the linear model. Furthermore, the condition of equal variances, termed homoscedasticity (homogeneity of variance), was tested in the applied linear regression analysis. When the assumption of homoscedasticity is not met for analytical data, an effective way to counteract the greater influence of the higher concentrations on the fitted regression line is to use weighted least squares linear regression.^{35,36}

LOD and LOQ were determined using MMC curves (in triplicate), by spiking blank samples at 8 concentrations levels (0.05–25 $\mu\text{g kg}^{-1}$) for each investigated matrix. For every analyte in each matrix, the standard error of the y -intercept, as well as the slope of the corresponding calibration curve (lower level equals concentration for which $S/N \geq 3$ for both product ions, and upper concentration level equals 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were calculated using the linest function (Microsoft Excel 2010). LOD equals the concentration corresponding to the blank response plus three times the standard error of the y -intercept, whereas LOQ equals two times the LOD value. CC_α and CC_β were also calculated by applying the calibration curve procedure described in the ICH guidelines.²⁴

Apparent recovery, repeatability, reproducibility and measurement uncertainty

For each matrix, apparent recovery, RSD_r , RSD_R and U were all calculated from the analysis of five concentration levels, spiked on representative blank samples in triplicate on three consecutive days. The apparent recovery was determined using MMC curves (five concentration levels, 5 to 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in case of sesame oil, and 50 to 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in case of lyophilised tomato juice). The measured concentration of the spiked blank samples (for each matrix) was determined by plotting the observed signal (expressed as the relative peak area) into the corresponding MMC curves. IUPAC defines the apparent recovery as the ratio of the predicted value obtained from the MMC curves divided by the actual/theoretical value.³⁷ RSD_r and RSD_R were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA). The combined measurement uncertainty (u_c) is an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance obtained by

combining the intermediate precision (RSD_R) and the bias of the analytical method, which consists of the uncertainty associated with the purity of the standards ($U[C_{ref}]$), the accuracy of the bias (S_{bias}) and the root mean square of the bias (RMS_{bias}).³⁸ Finally, U was obtained by multiplying u_c by a coverage factor of 2, which gives a level of confidence of approximately 95%.

7.3.5.3. Cartridge capacity and preconcentration factor

Evaluation of the cartridge capacity was carried out by percolating increasing volumes (5, 10, 25 and 40 mL) of a 0.5 mg L⁻¹ AOH or AME solution in phosphate buffer (50 mmol L⁻¹, pH = 8.2). The volume of washing solvent may also influence the breakthrough volume of the cartridges; therefore, it was also investigated (3, 5 and 10 mL). As shown in Table 4, recovery values changed depending on both, sample and washing solvent volumes. Recoveries higher than 79% were obtained from the MIP for volumes up to 25 mL using 5 mL of ACN/water (15:85, v/v) as washing solvent.

In order to evaluate the preconcentration factor of the developed MISPE methodology, 25 mL of phosphate buffer (50 mmol L⁻¹, pH = 8.2) spiked with increasing amounts of AOH or AME were percolated through the MIP and NIP cartridges. After a washing step with 3 mL of ACN/water (15:85, v/v), the mycotoxins were eluted with 1 mL of 1% TFA in MeOH and analysed by HPLC-FLD. As shown in Figure 5 neither saturation nor cartridge breakthrough was observed under the MISPE conditions, so that it can be concluded that there are enough binding sites in the polymer within the evaluated concentration range.

Considering the loaded and eluted volumes from the cartridges (25 and 1 mL, respectively), a theoretical preconcentration factor of 25 was expected. Experimental slopes of 24.7 and 24.1 were obtained for AOH and AME, respectively, which are in good agreement with the theoretical value, confirming the excellent preconcentration ability of the MIP. The NIP showed lower recoveries for AOH due to the low selectivity of this polymer. In the case of AME, both MIP and NIP displayed recoveries of about 100%, as shown in Table 4.

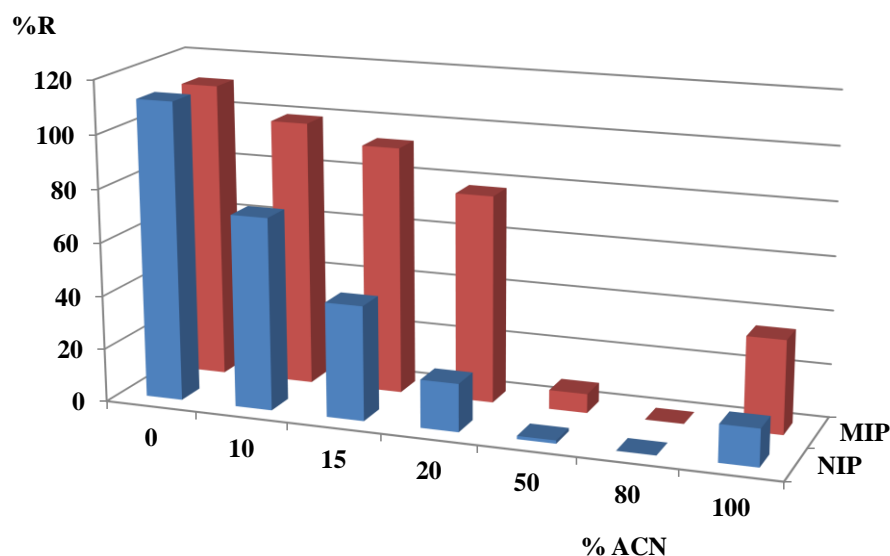


Figure 4. Extraction recoveries (%) of AOH from the MIP and the NIP after percolation of phosphate buffer (5 mL, 50 mmol L⁻¹, pH 8.5) spiked with 5 mg of the mycotoxin, using a washing step with 3 mL of ACN/water (0-100% ACN, v/v) followed by elution with 1 mL of 1% TFA in MeOH (RSD_{MIP} < 10%; RSD_{NIP} < 8%; n = 3).

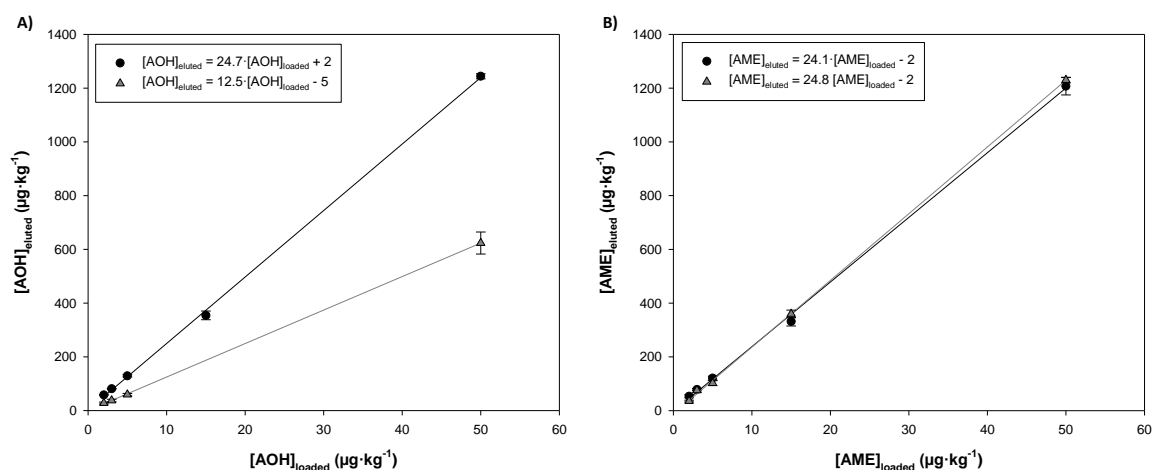


Figure 5. Capacity curves. Concentration of A) AOH and B) AME in the 1 mL eluted extracts (1% TFA in MeOH), as a function of the concentration of the mycotoxins in the loading samples (25 mL) after preconcentration in the MIP (●) or the NIP (▲), n = 3.

Table 4. Extraction recoveries (R, %) of AOH and AME from the MIP and the NIP after percolation of increasing volumes (5, 10, 25 and 40 mL) of 0.5 mg L⁻¹ AOH or AME in phosphate buffer (50 mmol L⁻¹, pH = 8.2), using a washing step with 3, 5 or 10 mL of ACN/water (15:85, v/v) followed by elution with 1 mL of 1% TFA in MeOH (n = 3).

Washing solvent (mL)	Loading solvent (mL)	AOH				AME			
		MIP		NIP		MIP		NIP	
		R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
3	5	97	4	30	2	94	1	93	2
	10	98	4	38	12	100	2	98	4
	25	99	2	45	11	97	1	97	3
	40	74	12	42	7	108	8	98	2
5	5	98	5	25	14	94	1	95	1
	10	98	1	33	1	105	1	90	2
	25	79	5	37	1	98	3	92	0
10	5	97	4	22	2	97	5	85	2
	10	73	1	25	19	101	1	91	4

7.3.5.4. Determination of the binding site distribution and affinities

The MIP/NIP beads (5 mg) were suspended in 1 mL ACN/water (15:85, v/v) mixture containing increasing concentrations of AOH (0.005–0.5 mmol L⁻¹, 8 points, $n = 2$) and the suspensions were incubated for 24 h at room temperature. After incubation, the supernatant was collected and analyzed by HPLC–FLD. The amount of analyte bound to the polymer (B) was calculated by subtracting the non-bound amount (F) from the initial AOH concentration in the mixture.

The experimental data were fitted to a Freundlich isotherm (FI) model, both for the MIP and the NIP (Figure 6) (Eq. 1):

$$\log B = \log a + m \log F \quad (1)$$

where B and F are the concentrations of bound and free AOH, respectively, a is the binding capacity and m is the heterogeneity index. The latter ranges between 0 and 1 and increases as the heterogeneity of the material decreases.

The affinity distribution (AD) can be calculated using Eq. 2 and the experimentally derived FI fitting parameters a and m .³⁹

$$N(k) = 2.303 am(1 - m^2)e^{2.303 \log K} \quad (2)$$

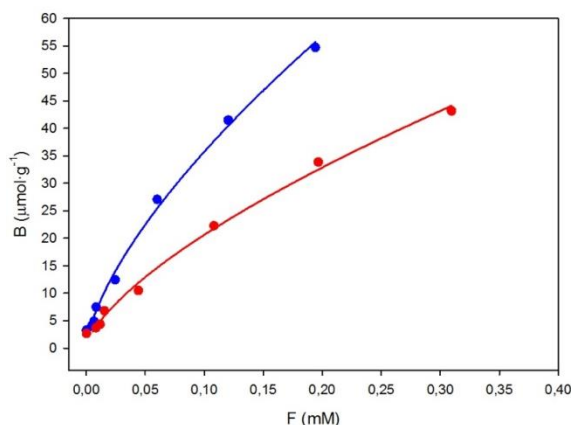


Figure 6. Equilibrium binding isotherms for the uptake of AOH by the MIP (blue) and the NIP (red) in ACN/water (15:85, v/v). F (mmol L⁻¹), concentration of the free solute; B (μmol g⁻¹), amount of solute bound to the polymer. The experimental data were fitted to a Freundlich (FI) isotherm model (see text).

The ADs calculated with this equation are valid within a range of binding affinities (K_{\min} and K_{\max}), calculated from the experimental maximum and minimum free analyte concentrations (F_{\min} and F_{\max}) and the relationships: $K_1 = K_{\min} = 1/F_{\max}$ and $K_2 = K_{\max} = 1/F_{\min}$. The apparent number of binding sites, \bar{N}_{K1-K2} , and the apparent weighted average affinity, \bar{K}_{K1-K2} , are calculated using Eqs. 3 and 4.

$$\bar{N}_{K1-K2} = c(1 - m^2)(K_1^{-m} - K_2^{-m}) \quad (3)$$

$$\bar{K}_{K1-K2} = \left(\frac{m}{m-1} \right) \left(\frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}} \right) \quad (4)$$

The results of the fit are collected in Table 5.

Table 5. Freundlich fitting parameters, weighted average affinity \bar{K}_{K1-K2} and number of binding sites (\bar{N}_{K1-K2}) for the AOH in the MIP and the NIP in ACN/water (15:85, v/v).³⁹

Freundlich isotherm model	a (μmol g ⁻¹ (mol L ⁻¹) ^{m})	m	R^2	\bar{N}_{K1-K2} (μmol g ⁻¹)	\bar{K}_{K1-K2} (mmol L ⁻¹) ⁻¹
MIP	166 ± 9	0.67 ± 0.02	0.980	30 ± 4	120 ± 10
NIP	97 ± 4	0.67 ± 0.03	0.997	24 ± 3	68 ± 5

7.3.5.5. UPLC-MS/MS chromatograms of a naturally contaminated tomato juice and sesame seed sample showing co-occurrence of AOH and AME

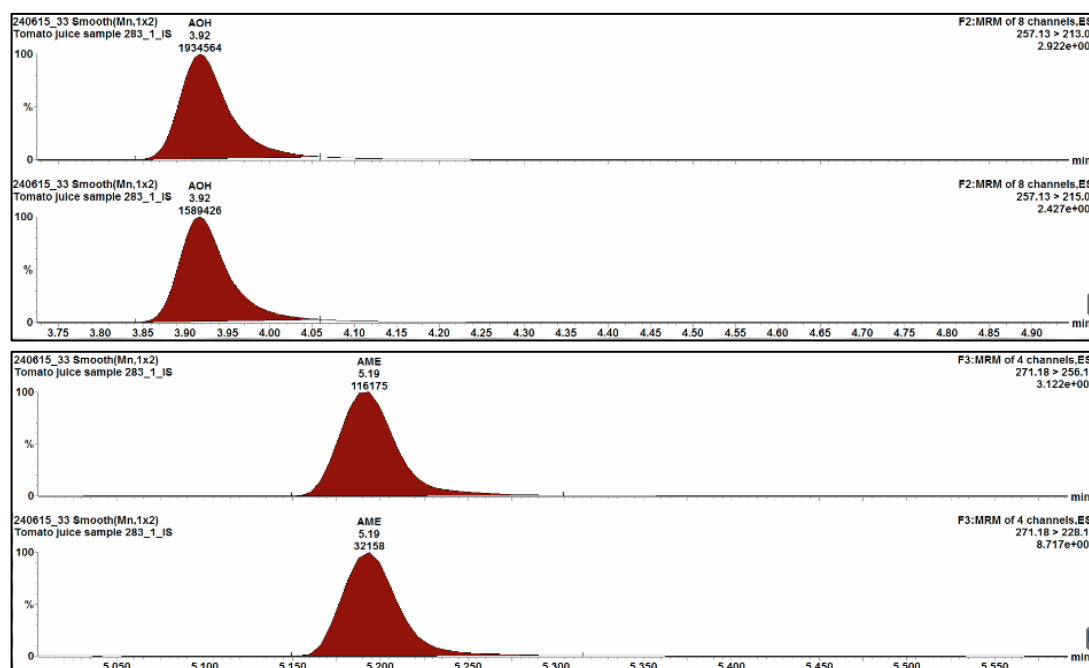


Figure 7. MISPE-UPLC-MS/MS analysis of a naturally contaminated sesame seed sample (sample "1S" in Table 3) showing co-occurrence of alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME) (for both mycotoxins, quantifier and qualifier ions are depicted).

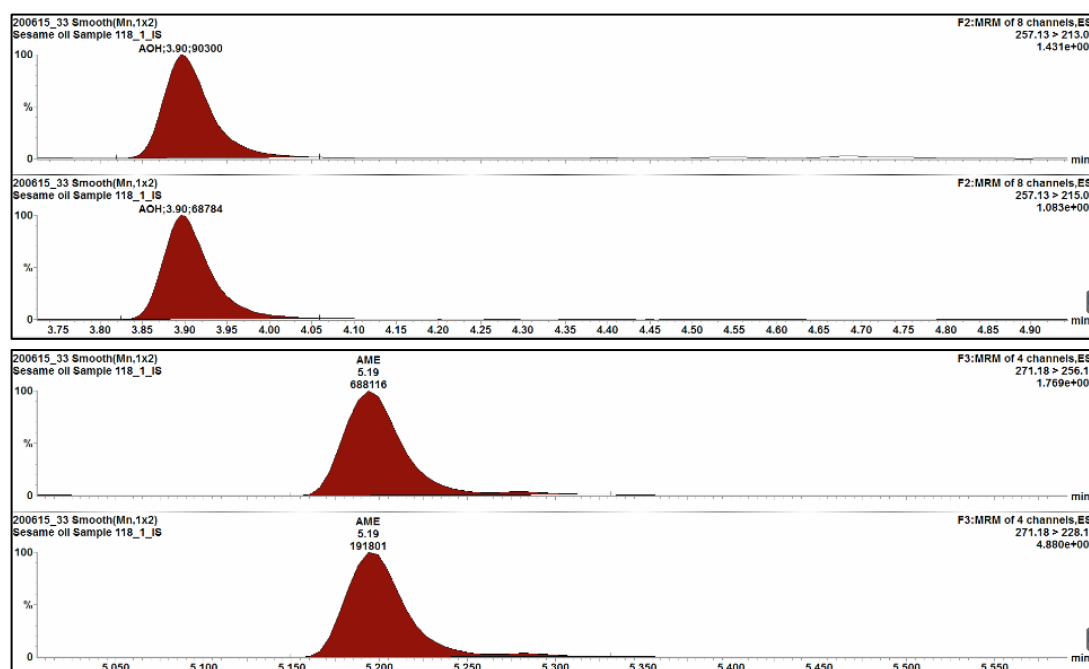


Figure 8. MISPE-UPLC-MS/MS analysis of a naturally contaminated tomato juice sample (sample "2T" in Table 3) showing co-occurrence of alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME) (for both mycotoxins, quantifier and qualifier ions are depicted).

Table 6. Comparison of the analytical characteristics of selected analytical methods for AOH and AME quantification in food samples.

Sample	Preconcentration and clean-up	Technique	LOD	LOQ	Precision RSD (%)	Concentration range studied	Reference
Foodstuff	n.d.	UPLC-MS/MS	n.d.	AOH: 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 1 – 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AOH: 8 - 20 AME: 11 - 20	AOH: 1 – 100 ng mL^{-1} AME: 1 – 100 ng mL^{-1}	39
Fruits	SPE (MCX and amino columns)	UPLC-MS/MS	n.d.	AOH: 1 ng mL^{-1} AME: 1 ng mL^{-1}	AOH: 1.3 – 4.4 AME: 1.3 – 4.5	AOH: 1 – 200 ng mL^{-1} AME: 1 – 200 ng mL^{-1}	40
Tomato	SPE (hydrophilic modified styrene)	LC-MS/MS	AOH: 0.2 – 2.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 0.3 – 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AOH: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 1 – 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AOH: 5.4 - 11 AME: 5.1 – 9.1	-	41
Foodstuff	n.d.	HPLC-MS/MS	AOH: 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 0.04 – 0.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AOH: 0.6 – 9.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 0.1 – 1.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AOH: 10 - 17 AME: 7.9 – 22	AOH: 25 – 2500 ng mL^{-1} AME: 2.6 – 260 ng mL^{-1}	42
Plant-Based Dietary Supplements	SPE (C18)	HUPLC-MS/MS	n.d.	AOH: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AOH: 2.7 – 4.3 AME: 1.5 – 7.5	AOH: 5 - 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 5 - 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$	13
Tomato- and Citrus-Based Foods	SPE (HLB)	UPLC-MS/MS	AOH: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	n.d.	AOH: 2.5 - 20 AME: 2.5 - 20	AOH: 20 - 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ AME: 0.4 - 8 $\mu\text{g L}^{-1}$	43
Foodstuff	n.d.	HPLC-TOF-MS	AOH: 7.4 – 17.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 4.7 – 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	n.d.	AOH: 8.6 - 9.7 AME: 7.4 – 8.6	AOH: 0 - 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 0 - 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	3
Foodstuff	SPE	LC-APCI-MS	AOH: 0.62 – 8.08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AME: 0.21 – 0.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$	AOH: 1.89 – 29.92 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AME: 0.54 – 1.53 $\mu\text{g mL}^{-1}$	AOH: 1.2 – 26.7 AME: 1.1 - 38.2	AOH: 10 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AME: 5 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	44
Tomato	SPE (BOND ELUT PLEXA)	UPLC-MS/MS	AOH: 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	n.d.	n.d.	AOH: 2.5 - 100 ng mL^{-1} AME: 2.5 - 100 ng mL^{-1}	45
Tomato juice	MISPE	UPLC-MS/MS	AOH: 0.58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 0.63 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AOH: 1.16 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 1.27 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AOH: 2 - 8 AME: 1 - 24	AOH: 0.05 – 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AME: 0.05 – 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	This work

Acknowledgments

This study was funded by MINECO/FEDER (CTQ2015-69278-C2) and the Belgian Federal Public Service of Health, Food Chain Safety and Environment (Contract RF12/6261-ALTER). A. Rico-Yuste and R.A.G. Abou-Hany thank MINECO for their F.P.I. doctoral grants. J.L. Urraca thanks CEI-Moncloa for a postdoctoral contract.

References

1. H. S. Hussein, J. M. Brasel, *Toxicology*, 2001, **167**, 101-134.
2. EFSA, *EFSA Journal*, 2011, **9**, 2407-2504.
3. E. Van de Perre, N. Deschuyffeleer, L. Jacxsens, F. Vekeman, W. Van Der Hauwaert, S. Asam, M. Rychlik, F. Devlieghere, B. De Meulenaer, *Food Control*, 2014, **37**, 165-170.
4. V. Ostry, *World Mycotoxin Journal*, 2008, **1**, 175-188.
5. E. Pfeiffer, N. H. Schebb, J. Podlech, M. Metzler, *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, **51**, 307-316.
6. European Commission Mandate (EC) M/520EN, 2013, 1-3.
7. EFSA, *EFSA Journal*, 2016, 1-2.
8. L. Broggi, C. Reynoso, S. Resnik, F. Martinez, V. Drunday, Á. R. Bernal, *Mycotoxin Research*, 2013, **29**, 17-22.
9. Y. Ackermann, V. Curtui, R. Dietrich, M. Gross, H. Latif, E. Märtilbauer, E. Usleber, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**, 6360-6368.
10. A. Malachová, M. Sulyok, E. Beltrán, F. Berthiller, R. Krska, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1362**, 145-156.
11. I. R. Pizzutti, A. de Kok, J. Scholten, L. W. Righi, C. D. Cardoso, G. Necchi Rohers, R. C. da Silva, *Talanta*, 2014, **129**, 352-363.
12. C. N. Ezekiel, W. A. Abia, I. M. Ogara, M. Sulyok, B. Warth, R. Krska, *LWT - Food Science and Technology*, 2015, **60**, 137-141.
13. Z. Dzuman, M. Zachariasova, O. Lacina, Z. Veprikova, P. Slavikova, J. Hajslova, *Talanta*, 2014, **121**, 263-272.
14. W. Jia, X. Chu, Y. Ling, J. Huang, J. Chang, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1345**, 107-114.

15. M. Á. Pavón, A. Luna, S. de la Cruz, I. González, R. Martín, T. García, *Food Control*, 2012, **25**, 45-52.
16. A. A. Burkin, G. P. Kononenko, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, **47**, 72-76.
17. C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, Smithers Rapra, Shrewsbury, U.K., 1st edn., 2013.
18. J. L. Urraca, M. D. Marazuela, E. R. Merino, G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1116**, 127-134.
19. J. L. Urraca, M. Castellari, C. A. Barrios, M. C. Moreno-Bondi, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1343**, 1-9.
20. M. Wulandari, J. L. Urraca, A. B. Descalzo, M. B. Amran, M. C. Moreno-Bondi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, **407**, 803-812.
21. R. A. G. Abou-Hany, J. L. Urraca, A. B. Descalzo, L. N. Gómez-Arribas, M. C. Moreno-Bondi, G. Orellana, *Journal of Chromatography A*, 2015, **1425**, 231-239.
22. M. Bayle, C. Roques, B. Marion, M. Audran, C. Oiry, F. M. M. Bressolle-Gomeni, G. Cros, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, **131**, 33-39.
23. M. M. Titirici, A. J. Hall, B. Sellergren, *Chemistry of Materials*, 2002, **14**, 21-23.
24. ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, Brussels, 2005.
25. *Official Journal of the European Communities* 2002, European Commission Decision 2002/657/EC, 221/8-221/36.
26. S. Asam, K. Konitzer, P. Schieberle, M. Rychlik, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, **57**, 5152-5160.
27. G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, A. B. Descalzo, J. L. Urraca, R. A. G. Abou Hany, PCT patent WO 2013/144394A1, 2013.
28. J. Walravens, H. Mikula, M. Rychlik, S. Asam, T. Devos, E. Njumbe Ediage, J. Diana Di Mavungu, L. Jacxsens, A. Van Landschoot, L. Vanhaecke, S. De Saeger, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64**, 5101-5109.
29. J. Walravens, H. Mikula, M. Rychlik, S. Asam, A. Van Landschoot, L. Vanhaecke, S. De Saeger, *Food Control*, 2016, **(Submitted)**.
30. E. Benito-Peña, V. González-Vallejo, A. Rico-Yuste, L. Barbosa-Pereira, J. M. Cruz, A. Bilbao, C. Alvarez-Lorenzo, M. C. Moreno-Bondi, *Food Chemistry*, 2016, **190**, 487-494.

31. J. L. Urraca, M. C. Carbajo, M. J. Torralvo, J. González-Vázquez, G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, **24**, 155-161.
32. M. C. Moreno-Bondi, J. L. Urraca, S. Carrasco, F. Navarro Villoslada, in *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, eds. C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, Smithers Rapra, Shrewsbury, U.K., 1st edn., 2013, ch. 2, pp. 23-66.
33. Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) software (In 12.02 ed.).
34. J. L. Urraca, R. Chamorro-Mendiluce, G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 1843-1854.
35. J. Walravens, H. Mikula, M. Rychlik, S. Asam, E. N. Ediage, J. D. Di Mavungu, A. Van Landschoot, L. Vanhaecke, S. De Saeger, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1372**, 91-101.
36. A. M. Almeida, M. M. Castel-Branco, A. C. Falcão, *Journal of Chromatography B*, 2002, **774**, 215-222.
37. M. Sulyok, F. Berthiller, R. Krska, R. Schuhmacher, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, **20**, 2649-2659.
38. E. Hund, D. L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, *Analytica Chimica Acta*, 2003, **480**, 39-52.
39. A. M. Rampey, R. J. Umpleby, G. T. Rushton, J. C. Iseman, R. N. Shah, K. D. Shimizu, *Analytical Chemistry*, 2004, **76**, 1123-1133.
40. P. López, D. Venema, T. de Rijk, A. de Kok, J. M. Scholten, H. G. J. Mol, M. de Nijs, *Food Control*, 2016, **60**, 196-204.
41. M. Wang, N. Jiang, H. Xian, D. Wei, L. Shi, X. Feng, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1429**, 22-29.
42. Á. Tölgyesi, J. Stroka, V. Tamosiunas, T. Zwickel, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015, **32**, 1512-1522.
43. S. Hickert, M. Bergmann, S. Ersen, B. Cramer, H.-U. Humpf, *Mycotoxin Research*, 2016, **32**, 7-18.
44. K. Zhao, B. Shao, D. Yang, F. Li, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, **63**, 343-348.
45. A. Prella, D. Spadaro, A. Garibaldi, M. L. Gullino, *Food Chemistry*, 2013, **140**, 161-167.
46. J. Noser, P. Schneider, M. Rother, H. Schmutz, *Mycotoxin Research*, 2011, **27**, 265-271.

7.4. Rapid determination of *Alternaria* mycotoxins in tomato samples by pressurised liquid extraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection

Este trabajo se realizó en paralelo al trabajo descrito en el apartado 7.3., utilizando los MIPs selectivos a micotoxinas de la *Alternaria*, pero aplicando diferentes técnicas de extracción. En esta ocasión, se desarrolló un método para el análisis de alternariol y su monometil éter en muestras de tomate empleando extracción con disolventes presurizados (PLE), combinado con extracción en fase sólida utilizando MIPs, y análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia con detección por fluorescencia (HPLC-FLD).

El objetivo principal del trabajo fue demostrar las ventajas del PLE para la extracción de micotoxinas frente a los métodos convencionales utilizados habitualmente. Para ello se optimizaron los parámetros críticos de la extracción con disolventes presurizados tales como la composición del disolvente de extracción, la temperatura, la presión y el número de ciclos de extracción, de manera que se obtuviera la extracción cuantitativa de las micotoxinas objetivo. Seguidamente los extractos se preconcentraron empleando MISPE con los MIPs descritos en el apartado 7.3., incluyendo algunas modificaciones. El método desarrollado se validó de acuerdo con la normativa europea 2002/657/EC en términos de recuperación, especificidad, linealidad, precisión, veracidad, límites de detección y cuantificación. El método optimizado se aplicó al análisis de muestras de tomate contaminadas naturalmente con el hongo *Alternaria*. La confirmación de la presencia de ambas micotoxinas se realizó mediante UPLC-MS/MS.

El procedimiento seguido implicó los siguientes pasos:

1. Optimización de las condiciones del proceso del método PLE.
2. Validación del método PLE-MISPE-HPLC-FLD.
3. Aplicación del método a muestras de tomate contaminadas con el hongo *Alternaria*.
4. Confirmación de la presencia de las micotoxinas en las muestras de tomate mediante UPLC-MS/MS.

Rapid determination of *Alternaria* mycotoxins in tomato samples by pressurised liquid extraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection

Alberto Rico-Yuste,[§] Lidia N. Gómez-Arribas,[§] María Concepción Pérez-Conde, Javier L. Urraca,^{*} María Cruz Moreno-Bondi.^{*}

[§] These authors contributed equally to this work.

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense, s/n, 28040 Madrid, Spain.

^{*} Corresponding authors: J.L. Urraca, Fax: (+) 34 913944329, E-mail: jurracar@ucm.es; M.C. Moreno-Bondi, Fax: (+) 34 913944329, E-mail: mcmbondi@ucm.es.

In Press:

Food Additives and Contaminants, Part A 2018

Copyright © 2018, with permission from Taylor and Francis

Abstract

A sensitive and reliable method using pressurised liquid extraction (PLE) followed by molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) and high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) has been developed for the analysis of alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME) in tomato samples. Influence of several extraction parameters that affect PLE efficiency were evaluated for the simultaneous extraction of both mycotoxins in the selected samples. AOH and AME were optimally extracted by using MeOH/water (25:75, *v/v*) at 70 °C as solvent, a pressure of 1000 psi and a single extraction cycle. The resulting PLE extracts were preconcentrated by molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) cartridges followed of analysis by HPLC with fluorescence detection ($\lambda_{\text{exc}} = 258$, $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm). The proposed method was applied to the analysis of AOH and AME in fortified tomato samples (20–72 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) with recoveries of 84–97% (RSD < 8%, $n = 6$) for AOH and 67–91% (RSD < 13%, $n = 6$) for AME. The detection limit for AOH and AME were 7 and 15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The ensuing PLE-MISPE-HPLC-FLD method was validated for the analysis of both mycotoxins in tomato samples in accordance with European Commission Decision 2002/657/EC.

7.4.1. Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by various fungi. Mycotoxins from the genus *Alternaria* and, particularly, the species *A. alternata*, possess especial toxicological importance.¹ According to the European Food Safety Authority (EFSA), alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME) are the most relevant mycotoxins produced by this genus.² These compounds can be encountered in a wide variety of harvested fruits and vegetables; also, they have been detected in various food commodities such as fruits, vegetables, cereals and seeds in some countries.^{3,4} Despite the adverse effects of *Alternaria* mycotoxins, regulatory authorities have not yet established maximum residue limits (MRLs) for these substances in foodstuffs; however, the EC is considering regulating the levels of some in certain foods, which will require developing standardised analytical methods for their determination.^{5,6}

Most existing methods for extracting AOH and AME from foodstuffs are based on solid–liquid extraction (SLE) followed by salting-out to facilitate phase separation.^{7,8} A clean-up step using solid phase extraction (SPE) is usually required before chromatographic analysis of the mycotoxins with optical^{9,10} or mass spectrometry detection.^{7,11} Recently, QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) methodology has also been used to determine *Alternaria* mycotoxins in a broad variety of foodstuffs.^{12,13}

Regarding the complexity of the food matrices, an efficient mycotoxin extraction is required for a complete analysis. Conventional extraction techniques (e.g. Soxhlet) are being displaced by improved faster alternatives, such as pressurised liquid extraction (PLE). This technique combines high pressures and moderate temperatures to enhance analyte solubility and mass transfer kinetics yielding maximum extraction recoveries.¹⁴ PLE is considered operationally very simple, automatic and environmentally friendly avoiding the use of halogenated solvents. Moreover, the process generally requires lower consumption of organic solvents, and reduced extraction times compared with traditional extraction methods.¹⁵ On the other hand, some properties of the extraction solvents, such as the dielectric constant, can be modified in the PLE conditions allowing the extraction of compounds with a wide range of polarities and redefining their

behaviour in relation to the analytes.¹⁶ This technique has already been used to extract other mycotoxins such as aflatoxins, ochratoxin A or zearalenone in different food commodities.¹⁷⁻¹⁹

Subsequent clean-up and selective preconcentration of the mycotoxins before chromatographic analysis were done by molecularly imprinted polymers solid phase extraction (MISPE) as an alternative to commercial SPE sorbents. These tailor-made materials possess specific binding sites complementary to the molecule used as template in their synthesis. After the template is removed, the polymer selectively retains the target analyte even in complex samples.²⁰ These synthetic materials, which mimic the selective recognition of antibodies and enzymes, have been used for analytical separations and sensor development, and also for controlled release of selected targets, among other purposes.²¹ The use of MIPs as an alternative to commercial SPE sorbents for clean-up and selective preconcentration has increased substantially in recent years.²²

This paper describes the optimisation of a new analytical method based on PLE followed by molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) for the determination of AOH and AME in tomato samples. The method provides a significant reduction in sample treatment time, enhanced efficiency in comparison to extractions at room temperature and atmospheric pressure, low organic solvent volume consumption (ecologic) and a high degree of automation. Analytical sensitivity and selectivity were improved by using a MISPE preconcentration step prior to HPLC.

Several variables influencing PLE performance were optimised, namely: MeOH concentration in the extractant, temperature, pressure and number of extraction cycles. The ensuing PLE-MISPE-HPLC-FLD method was validated under the optimum extraction conditions in accordance with EU Commission Decision 2002/657/EC.²³ The method was applied to a moulded tomato sample and the results were confirmed by LC-MS/MS.

7.4.2. Materials and methods

7.4.2.1. Reagents and chemicals

Methacrylamide (MAM), 4-vinylpyridine (VIPY) and ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The initiator, *N,N*-azo-*bis*-(2,4-dimethyl)valeronitrile (ABDV), was purchased from Wako (Neuss, Germany) and used as received. AOH was supplied by Apollo Scientifics (Bredbury, Cheshire, UK); and AME was from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH, HPLC-grade) were supplied by SDS (Peypin, France) and trifluoroacetic acid (TFA, HPLC-grade, 99%) by Fluka (Buchs, Switzerland). Water was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). The monomers used (MAM and VIPY) were purified as required by chromatography immediately before use, using an inhibitor-remover from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). AOH and AME individual stock solutions containing a concentration of 200 mg·L⁻¹ in MeOH were prepared and stored at 4 °C in the dark for no longer than 1 month.

7.4.2.2. Preparation of spiked tomato samples

Tomatoes were blended with a Turbomix plus 300 hand whisker from Moulinex (Barcelona, Spain). Analyte recovery was assessed by fortifying homogenised samples with AOH and AME standard solutions at five different concentration levels over the range 25–225 and 50–250 µg·kg⁻¹, respectively. The samples previously checked not to contain the mycotoxins at levels above the detection limits of the proposed method. Once fortified, samples were equilibrated by shaking in the dark for 30 min and stored at 4 °C until use.

7.4.2.3. AOH and AME MISPE

The MIP polymer was prepared as described elsewhere.²⁴ Solid-phase extraction cartridges (1 mL, Varian, Palo Alto, CA, USA) were packed with 25 mg of MIP and equilibrated with 10 mL of MeOH and 10 mL of phosphate buffer (50 mmol·L⁻¹, pH 8.2). The PLE extracts thus obtained were made to 25 mL with phosphate buffer (50 mmol·L⁻¹, pH 8.2) and percolated through the cartridges at a constant flow rate of 0.6 mL min⁻¹ with the aid of an 8-channel ISM936D peristaltic pump from Ismatec (Oak Harbor, WA,

US). The cartridges were then rinsed with 2 mL of ACN/water (5:95, *v/v*) and 3 mL of ACN/water (15:85, *v/v*) to remove non-specifically retained compounds. Finally, the mycotoxins were eluted with 1% TFA in MeOH, and the cartridges equilibrated with 5 mL of MeOH and 5 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 8.5) before each new use. The eluates from the MISPE column were directly injected into the HPLC system for analysis as described in HPLC–FLD conditions section.

7.4.2.4. HPLC–FLD conditions

Chromatographic analyses were done on an HP-1100 HPLC instrument from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an on-line degasser, an autosampler, an automatic injector, a column thermostat and a fluorescence detection system (FLD). Chromatographic separation of the mycotoxins was performed on an AQUA™ C₁₈ (polar encapped) HPLC column (250 × 4.6 mm I.D., 5 µm film thickness) placed behind a C₁₈ guard column (4.0 × 3.0 mm, 5 µm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The mobile phase was passed according to a gradient where solvent A (Milli-Q water containing 0.01% TFA) and solvent B (MeOH) were used as follows: 55% B (8 min, 1 mL·min⁻¹), 55–70% B (1 min, 1 mL·min⁻¹), 70 % B (2 min, 1 mL·min⁻¹) and 70–55% B (5 min, 1 mL·min⁻¹). Then, the initial conditions (1 mL·min⁻¹) were maintained for 5 min prior to the next injection. The column temperature was kept at 35 °C throughout. The injected volume was 8 µL and all compounds were eluted within 20 min. The fluorescence excitation and emission wavelength were set at 258 and 440 nm, respectively. Quantification was based on external calibration peak area measurements. Calibration graphs were linear over the range 6–1000 µg·L⁻¹ (10 points) for both mycotoxins ($r^2 > 0.9992$).

7.4.2.5. PLE extraction and MISPE preconcentration

Pressurised liquid extraction (PLE) was performed on an ASE 200 apparatus from Dionex (Sunnyvale, CA, USA) equipped with 22 mL stainless steel extraction cells furnished with containing cellulose filters. The extracts were collected in 60 mL glass vials. An amount of 5 g of ground tomato was accurately weighed and thoroughly mixed with 5 g of diatomaceous earth until complete dispersion, the resulting dispersion being

used to fill the extraction cells. The optimum PLE extraction conditions are shown in Table 1.

Table 1. Optimum PLE conditions for the extraction of AOH and AME from food samples.

Parameter	Optimum value
Extractant	MeOH:water (25:75, v/v)
Temperature (°C)	70
Pressure (psi)	1000
Heat-up time (min)	5
Extraction time (min)	5
Flush volume (%)	60
Number of cycles	1

A total extract volume of approximately 33 mL was obtained at the end of each extraction run. The extracts were evaporated to an approximate volume of 22 mL on a Turbovap LV evaporator from Zymark (Hopkinton, MA, USA). A volume of 100 µL of MeOH was added to the evaporated extracts in order to avoid mycotoxin precipitation (especially AME, which is poorly soluble in aqueous media). Then, the extracts were filtered through SPE frits (20 µm pore size, Agilent Technologies) to remove any precipitate and made to 25 mL with phosphate buffer (50 mmol·L⁻¹, pH 8.2). Finally, the extracts were percolated through MISPE cartridges and analysed as described in HPLC–FLD conditions and PLE extraction and MISPE preconcentration sections. UPLC–MS/MS (UPLC–MS/MS equipment and chromatographic conditions section, Supplemental Information, Section 7.4.5.1.) was used for confirmatory analysis of a tomato sample naturally infected with moulds.

7.4.3. Results and discussion

7.4.3.1. Optimisation of the PLE method for AOH and AME extraction from tomato samples

The PLE extraction of AOH and AME from tomato samples was optimised by finding the best values of the following influential variables: solvent composition, temperature, pressure and number of cycles. Tests were carried out by using 5 g of blank ground tomato samples that were fortified with a 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ concentration of each mycotoxin.

Diatomaceous earth in a mass ratio of 1:1 was used as dispersant to facilitate homogeneous distribution of the samples.¹⁵ The following parameters values were used in all tests (Table 5, Supplemental Information, section 7.4.5.2.): heat-up time, 5 min; extraction time, 5 min; flush volume, 60%; purge time, 1 min; cell volume, 22 mL; total extraction time, 13 min; and total solvent volume, ~33 mL. The optimum PLE conditions were subsequently used to develop the proposed method and analyse samples.

AOH and AME in food commodities are usually extracted by using mixtures of water and organic solvents,^{11,25} but particularly MeOH, in which both mycotoxins are highly soluble. In this work, we used MeOH/water mixtures containing 0, 25, 50, 75 or 100% MeOH (*v/v*) as extractants. The solubility of the two mycotoxins is strongly influenced by temperature, which additionally influences mass transfer kinetics and solvent viscosity.¹⁹ Two different temperatures (50 and 70 °C) were used under a constant pressure of 1000 psi. AOH and AME were confirmed to remain stable under the previous solvent, temperature and pressure conditions (results not shown). Table 5 (Supplemental Information, section 7.4.5.2.) shows the AOH and AME recoveries obtained. Increasing the water content of the extractant decreased the extraction efficacy owing to the relatively low solubility of both analytes in aqueous media. At 70 °C, however, both mycotoxins were recovered quantitatively (96.9% for AOH and 90.2% for AME; $\text{RSD} \leq 4\%$, $n = 3$) with MeOH/water mixtures containing more than 25% (*v/v*) MeOH by effect of analyte–matrix interactions being disrupted, and the solubility of the mycotoxins increased, at increased temperatures. A (25:75, *v/v*) MeOH/water mixture, 70 °C and 1000 psi (1 psi = 7 kPa) were thus selected for further testing.

The effect of pressure on extraction recovery was assessed over the range 1000–3000 psi. Recovery was always higher than 90% and 86% for AME and for AOH ($RSD \leq 8\%$, $n = 3$), respectively, albeit slightly lower at pressures above 2000 psi. In theory, a high PLE pressure should facilitate solvent penetration into the sample matrix, and hence facilitate disruption of mycotoxin–matrix interactions and increase analyte recovery as a result. However, pressures over 2000 psi rendered darker extracts and broadened peaks at the beginning of the chromatogram by effect of other matrix components being co-extracted. A pressure of 1000 psi was thus selected for further testing.

Usually, the number of cycles used to extract a sample has a substantial effect on extraction efficiency. The volume of solvent flushed in each cycle can be calculated as the product of “flush %” (60%) by the size of the PLE cell divided into the number of cycles with exclusion of the fill volume used in the first cycle.¹⁹ Recoveries were assessed by using one, two and three cycles (Table 5, Supplemental Information, section 7.4.5.2.). AOH and AME were fully extracted with good recoveries and precision ($R_{AOH} = 96.9\%$, $RSD = 4\%$; $R_{AME} = 90.2\%$, $RSD = 3\%$) in a single cycle (extraction time = 5 min). In fact, using 2 or 3 extraction cycles diminished recovery of both mycotoxins, but particularly AME, so a single cycle (total PLE extraction time = 13 min per sample) was used in subsequent tests. Extraction recoveries achieved with this method are higher than those reported for commonly used QuEChERS methods (Table 6, Supplemental Information, section 7.4.5.3.) and similar to other techniques based on SLE. The main advantage of this procedure is the reduction of the extraction times and the method simplification. In this approach, the extraction time per sample is 13 min, whereas other procedures require more than one hour.^{4,13}

7.4.3.2. Calibration of the PLE–MISPE–HPLC–FLD method

Matrix-matched calibration curves were constructed from blank tomato PLE extracts spiked with six different concentrations over the range 20–225 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for AOH and 35–250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for AME. The curves for both mycotoxins exhibited good linearity ($r > 0.999$) over these ranges. The resulting detection limits, calculated for a signal-to-noise ratio of 3:1, were 7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for AOH and 12 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for AME.

7.4.3.3. Validation of the PLE–MISPE–HPLC–FLD method

The proposed method was validated in terms of recovery, specificity, linearity, precision (repeatability, within-laboratory reproducibility), trueness, decision limit (CC_α) and detection capability (CC_β) according to the guidelines in European Commission Decision 2002/657 /EC.²³

The specificity of the method was assessed by analysing 20 blank tomato samples. No chromatographic peaks were detected at the retention time for either mycotoxin. Figure 1 (Supplemental Information, section 7.4.5.4.) compares the chromatograms for a blank tomato extract fortified with the mycotoxins and a non-fortified extract.

Because the European Union has not yet established an MRL for AOH or AME in tomato, in this work we assessed the accuracy and repeatability of the proposed method by spiking tomato samples with the two mycotoxins at three different concentration levels over the range 20–72 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. These values correspond to 1, 1.5 and 2 times the limit of quantification (LOQ) of the method for each mycotoxin.²³

Mean recoveries were calculated by comparing the analytical responses of the spiked samples with those for blank tomato extracts spiked with AOH and AME after PLE–MISPE but immediately before HPLC injection. Recoveries were 84–97% (RSD < 8%, $n = 6$) for AOH and 67–91% (RSD < 13%, $n = 6$) for AME. This method provides better or similar efficiencies in comparison to extractions at room temperature and atmospheric pressure coupled to more costly analysis techniques (HPLC-MS/MS), low organic solvent consumption, and a high degree of automation (Table 2, Supplemental Information, section 7.4.5.3.). Therefore, it could be easily applied for routine analysis of both mycotoxins in solid samples.

The slightly lower recoveries of AME are consistent with its lower solubility in the extractant. Within-laboratory reproducibility was determined by analysing extracts of tomato samples previously spiked at the previous three concentration levels. The samples were analysed in triplicate on three different days. As can be seen from the results were acceptable and reproducibility was good.

Table 2. Accuracy and precision of the proposed PLE–UHPLC–FLD method in the determination of AOH and AME from tomato.

	Nominal conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Mean conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Repeatability (% RSD)	Reproducibility (% RSD)
AOH	20	20 ± 1	6	5
	30	30 ± 2	4	4
	40	39 ± 2	5	4
AME	36	34 ± 6	9	7
	54	57 ± 6	13	10
	72	69 ± 4	11	8

The decision limit (CC_α) and detection capability (CC_β) were also calculated. Commission Decision 2002/657/EC defines CC_α for substances without an MRL as the lowest concentration level at which a method can discriminate with an error probability of 1% that a particular analyte will be present in a sample. By contrast, CC_β is the lowest concentration at which a method is able to detect truly contaminated samples with an error probability of 5%. Therefore, CC_α is used to prevent false positives and CC_β to prevent false negatives.²³ These two parameters were determined by using the calibration curve procedure described in Commission Decision 2002/657/EC, which involves calculating the intercept of a calibration curve obtained from samples fortified with the analytes at different concentration levels above and below their MRLs. Table 3 shows the CC_α and CC_β values for the target mycotoxins in the tomato samples.

Table 3. LOD, LOQ, CC_α and CC_β values for the target mycotoxins.

Analyte	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	CC_α ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	CC_β ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
AOH	7	20	8.9	17.8
AME	12	36	23.1	46.2

7.4.3.4. Analysis of tomato samples infected with moulds

The proposed method was used to detect mycotoxins produced by *Alternaria alternata* in a tomato sample naturally infected with black moulds that had been stored

refrigerated at 4 °C for 3 months. The sample was found to contain $(786 \pm 34) \mu\text{g AOH}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $(85 \pm 13) \mu\text{g AME}\cdot\text{kg}^{-1}$.

The method was validated in terms of recovery by spiking 5 g of sample with increasing concentrations of AOH (0, 1000 and 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and AME (0, 100 and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). As shown in Table 4, recoveries ranged from 96 to 105% and the results differed little from those obtained with unfortified samples. Figure 2 (Supplemental Information, section 7.4.5.5.) shows the HPLC–FLD and UPLC–MS/MS chromatograms for the incurred tomato sample (conditions described in UPLC–MS/MS equipment and chromatographic conditions section, Supplemental Information, section 7.4.5.1.). A confirmatory analysis was done according to the rules of Commission Decision 2002/657/EC that involved comparing the signal intensity ratios for the two transitions of AOH (257.1 > 213.1 for quantification and 257.1 > 215.1 for confirmation) and AME (271.2 > 256.2 for quantification and 271.2 > 228.2 for confirmation) with those for fortified extracts. The AOH and AME ion ratios for the incurred sample fell within 20% of the mycotoxins ion ratios in the matrix-matched standards and hence within the confirmation guidelines laid down in Decision 2002/657/EC.²³

Table 4. Mycotoxin contents of a tomato sample infected with black moulds (n = 3; $\alpha = 0.05$).

Mycotoxin	Added conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Found conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD (%)	Recovery (%)
AOH	0	786	2	–
	1000	1793	1	101
	2000	2763	1	97
AME	0	85	6	–
	100	186	4	101
	200	289	2	105

7.4.4. Conclusions

The proposed PLE method has several advantages over classical extraction methods for AOH and AME including good extraction efficiency (67–97%) with low volumes of MeOH (8 mL per sample), short extraction times (around 13 min per sample) and reduced sample handling thanks to the method being automated to some extent.

These advantages result in good reproducibility (RSD < 8% for AOH and RSD < 13% for AME). *Alternaria alternata* mycotoxins were simultaneously extracted under the optimised PLE conditions using an extractant composition of MeOH/water (25:75, *v/v*) with an extraction temperature of 70 °C in a single extraction cycle at 1000 psi of pressure. The optimised PLE–MISPE–HPLC–FLD method was validated according to the guidelines in Commission Decision 2002/657/EC and successfully used to determine AOH and AME in tomato samples. Both mycotoxins were detected in samples naturally infected with black moulds and the results confirmed by UPLC–MS/MS. The optimised method could be easily implemented in routine analyses for *Alternaria* mycotoxins in food, following the trend towards the development of environmental-friendly extraction methods.

7.4.5. Supplementary data

7.4.5.1. UPLC–MS/MS equipment and chromatographic conditions

UPLC–MS/MS confirmatory analyses were done as described elsewhere,²⁶ using an Acquity UPLC system from Waters (Milford, MA, USA) coupled to a Xevo TQ-S triple quadrupole mass spectrometer, also from Waters, that was equipped with an electrospray interface (ESI) and operated in negative ESI mode. Separation was done on an Acquity UPLC HSS (100mm × 2.1mm, 1.8 µm) column from Waters (Milford, MA, USA) at 35 °C. The chromatographic gradient involved using 1% acetic acid (solvent A) and ACN containing 1% acetic acid (solvent B) as follows: 5% A (0.5 min, 0.4 mL·min⁻¹), 31–38% B (3.75 min, 0.4 mL·min⁻¹), 90% B (0.85 min, 0.4 mL·min⁻¹), 5% B (0.5 min, 0.3 mL·min⁻¹) and 5% B (3 min, 0.3 mL·min⁻¹). Then, the column was re-equilibrated prior to the next injection. The injected volume was 5 µL and the total run time 7 min. The ESI source was operated in the negative ionization mode under the following conditions: capillary voltage, 2.95 kV; source block and desolvation temperature, 125 and 350 °C, respectively; desolvation and nebulizer gas flow-rate, 800 and 50 L·h⁻¹, respectively; and argon pressure in the collision cell, 9.1×10⁻³ mbar. Data acquisition for quantification was performed by using the multiple reaction monitoring (MRM) mode to follow two transitions for AOH (257.1 > 213.1 and 257.1 > 215.1, corresponding to the fragment ions [MH–CO₂]⁻ and [MH–CH₂OH]⁻, respectively) and another two for AME (271.2 > 256.2

and 271.2 > 228.2, corresponding to the fragment ions $[\text{MH}-\text{CH}_3]^-$ and $[\text{MH}-\text{CO}_2]^-$, respectively).

7.4.5.2. PLE optimization

Table 5. Extraction recoveries (R, %, n = 3) for AOH and AME (2000 ng·g⁻¹) obtained after PLE process as a function of the MeOH content, temperature, pressure and the number of cycles. In all the cases some parameters were fixed: heat-up time 5 min, extraction time 5 min, flush volume 60 %, purge time 1 min, cell volume 22 mL, total extraction time 13 min and total solvent used 33 mL.

MeOH (%)	T (°C)	Pressure (psi)	Number of cycles	R _{AOH} (%)	RSD _{AOH} (%)	R _{AME} (%)	RSD _{AME} (%)
100	50	1000	1	97.6	3	---	---
75	50	1000	1	91.1	5	---	---
50	50	1000	1	87.8	4	---	---
25	50	1000	1	83.8	9	---	---
0	50	1000	1	68.4	3	---	---
100	70	1000	1	94.8	6	95.3	3
75	70	1000	1	92.2	8	93.1	4
50	70	1000	1	93.5	6	90.9	7
25	70	1000	1	96.9	4	90.2	3
10	70	1000	1	90.3	3	66.6	6
0	70	1000	1	84.1	11	39.4	14
25	70	2000	1	90.8	1	86.7	2
25	70	3000	1	91.8	8	88.6	5
25	70	1000	2	82.7	3	42.7	12
25	70	1000	3	88.2	2	55.2	3

7.4.5.3. Comparison of analytical methods

Table 6. Comparison of the recoveries of selected analytical extraction methods for AOH and AME in tomato or tomato-based samples.

Extraction technique	Extraction Solvent	Extraction recovery (%)	Preconcentration and clean-up	Analysis Technique	Total recovery (%)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Reference
LLE	PBS	n.d.	SPE	LC-MS/MS	AOH: 81.3 – 102.2 AME: 50.8 – 82.0	AOH: 1.01 AME: 1.21	27
SLE	ACN Ethyl acetate Formic acid	AOH: 83.0 AME: 96.0	---	HPLC-MS	AOH: 74.0 AME: 90.0	AOH: 12.2 AME: 13.5	28
SLE	MeOH DNPH	AOH: > 70 AME: > 70	SPE	LC-MS/MS	AOH: 89.0 – 92.6 AME: 89.0 – 89.3	AOH: 2 AME: 1	25
UAE	ACN Water MeOH	n.d.	SPE	LC-MS/MS	AOH: 78.4 – 82.1 AME: 65.9 – 79.3	AOH: 5 AME: 0.1	11
UAE	PB	n.d.	MISPE	HPLC-FLD	AOH: 81.0 – 103.0	AOH: n.d.	10
QuEChERS	ACN Water Formic acid	n.d.	---	LC-MS/MS	AOH: 112.0 AME: 101.0	AOH: 0.7 AME: 0.3	4
QuEChERS	ACN Water	59.0 – 86.0	---	LC-MS/MS	AOH: 90.4 – 108.4 AME: 90.7 – 105.6	AOH: 0.3 – 1.1 AME: 0.3 – 1.4	13
SLE	ACN Water Formic acid	n.d.	---	LC-MS/MS	AOH: 83.0 AME: 75.0	AOH: 0.2 – 2.8 AME: 0.04 – 0.4	3
PLE	PBMeOH	AOH: 96.9 AME: 90.2	MISPE	HPLC-FLD	AOH: 84.0 – 97.0 AME: 67.0 – 91.0	AOH: 7 AME: 12	This work

n.d.: not determined. LLE: Liquid-liquid extraction; SLE: Solid-liquid extraction; UAE: Ultrasound assisted extraction; PLE: Pressurised liquid extraction; SPE: Solid phase extraction; MISPE: Molecularly imprinted solid phase extraction; HAC: Acetic acid; DNPH: 2,4-Dinitrophenylhydrazine; PBS: Phosphate buffer saline; PB: Phosphate buffer.

7.4.5.4. Specificity of the method

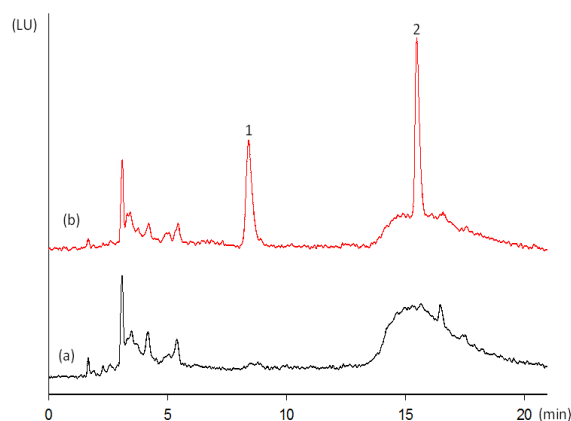


Figure 1. Representative HPLC-FLD chromatograms of: (a) an extract of blank tomato; (b) an extract of blank tomato spiked with 125 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of AOH (1) and 150 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ AME (2). Chromatographic conditions are described in Section 7.4.2.4.

7.4.5.5. UPLC-MS/MS chromatograms for the incurred tomato sample

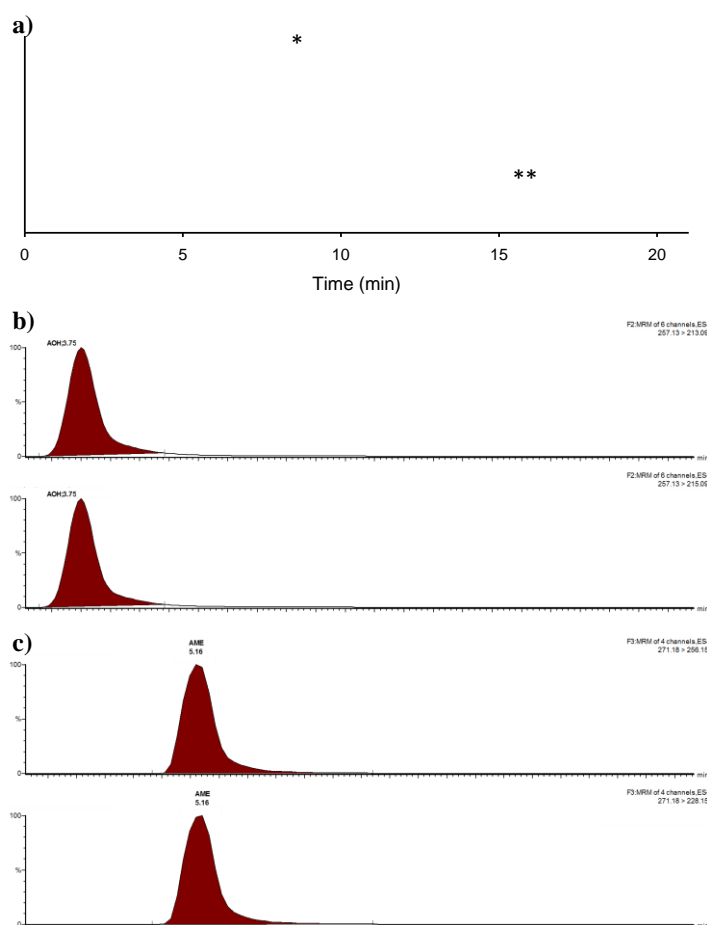


Figure 2. (a) HPLC-FLD chromatogram for the PLE-MISPE extract from a tomato sample naturally infected with black moulds. Peaks marked with one and two asterisks (*) and (**) in chromatogram (a) correspond to the suspected AOH and AME, respectively. The UPLC-MS/MS chromatograms (b) and (c) confirm the presence of AOH and AME, respectively, in the contaminated tomato sample.

Acknowledgements

This work was funded by MINECO/FEDER (CTQ2015-69278-C2-1-R/AIE). A. Rico-Yuste thanks MINECO for award of a grant. The authors are all grateful to Prof S. de Saeger and Dr. J. Walravens of the Laboratory of Food Analysis at Ghent University for their UPLC–MS/MS analysis of the contaminated tomato sample.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was funded by MINECO/FEDER [CTQ2015-69278-C2-1-R/AIE].

References

1. V. Ostry, *World Mycotoxin Journal*, 2008, **1**, 175-188.
2. EFSA, *EFSA Journal*, 2011, **9**, 2407-2504.
3. S. Hickert, M. Bergmann, S. Ersen, B. Cramer, H.-U. Humpf, *Mycotoxin Research*, 2016, **32**, 7-18.
4. P. López, D. Venema, T. de Rijk, A. de Kok, J. M. Scholten, H. G. J. Mol, M. de Nijs, *Food Control*, 2016, **60**, 196-204.
5. European Commission Mandate (EC) M/520EN, 2013, 1-3.
6. EFSA, *EFSA Journal*, 2016, 1-2.
7. M. Wang, N. Jiang, H. Xian, D. Wei, L. Shi, X. Feng, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1429**, 22-29.
8. I. R. Pizzutti, A. de Kok, J. Scholten, L. W. Righi, C. D. Cardoso, G. Necchi Rohers, R. C. da Silva, *Talanta*, 2014, **129**, 352-363.
9. M. E. H. Müller, U. Korn, *Food Control*, 2013, **34**, 191-197.
10. R. A. G. Abou-Hany, J. L. Urraca, A. B. Descalzo, L. N. Gómez-Arribas, M. C. Moreno-Bondi, G. Orellana, *Journal of Chromatography A*, 2015, **1425**, 231-239.
11. K. Zhao, B. Shao, D. Yang, F. Li, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, **63**, 343-348.

12. Z. Dzuman, M. Zachariasova, O. Lacina, Z. Veprikova, P. Slavikova, J. Hajslova, *Talanta*, 2014, **121**, 263-272.
13. J. Walravens, H. Mikula, M. Rychlik, S. Asam, T. Devos, E. Njumbe Ediage, J. Diana Di Mavungu, L. Jacxsens, A. Van Landschoot, L. Vanhaecke, S. De Saeger, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64**, 5101-5109.
14. S. C. Mandal, V. Mandal, A. K. Das, in *Essentials of Botanical Extraction*, eds. S. C. Mandal, V. Mandal and A. K. Das, Academic Press, Boston, 2015, ch. 7, pp. 137-163.
15. E. Rodriguez, F. N. Villoslada, M. C. Moreno-Bondi, M. D. Marazuela, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 605-613.
16. J. G. Figueroa, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sánchez, R. Quirantes-Piné, A. Segura-Carretero, *Electrophoresis*, 2018, **39**, 1908-1916.
17. L. Campone, A. L. Piccinelli, R. Celano, M. Russo, A. Valdés, C. Ibáñez, L. Rastrelli, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, **407**, 2899-2911.
18. D. Chen, X. Cao, Y. Tao, Q. Wu, Y. Pan, L. Huang, X. Wang, Y. Wang, D. Peng, Z. Liu, Z. Yuan, *Journal of Chromatography A*, 2012, **1253**, 110-119.
19. J. L. Urraca, M. D. Marazuela, M. C. Moreno-Bondi, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **524**, 175-183.
20. A. N. Baeza, J. L. Urraca, R. Chamorro, G. Orellana, M. Castellari, M. C. Moreno-Bondi, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1474**, 121-129.
21. C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, Smithers Rapra, Shrewsbury, U.K., 1st edn., 2013.
22. A. Martín-Esteban, in *Advanced Molecularly Imprinting Materials*, John Wiley & Sons, Inc., 2016, pp. 1-27.
23. *Official Journal of the European Communities* 2002, Decision 2002/657/EC, 221/8-221/36.
24. A. Rico-Yuste, J. Walravens, J. L. Urraca, R. A. G. Abou-Hany, A. B. Descalzo, G. Orellana, M. Rychlik, S. De Saeger, M. C. Moreno-Bondi, *Food Chemistry*, 2018, **243**, 357-364.
25. Á. Tölgyesi, J. Stroka, V. Tamosiunas, T. Zwickel, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015, **32**, 1512-1522.
26. J. Walravens, H. Mikula, M. Rychlik, S. Asam, E. N. Ediage, J. D. Di Mavungu, A. Van Landschoot, L. Vanhaecke, S. De Saeger, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1372**, 91-101.

27. A. Prella, D. Spadaro, A. Garibaldi, M. L. Gullino, *Food Chemistry*, 2013, **140**, 161-167.
28. E. Van de Perre, N. Deschuyffeleer, L. Jacxsens, F. Vekeman, W. Van Der Hauwaert, S. Asam, M. Rychlik, F. Devlieghere, B. De Meulenaer, *Food Control*, 2014, **37**, 165-170.

7.5. Molecularly imprinted polymer based sensor containing europium (III) ions for tenuazonic acid determination in food samples

En el último trabajo incluido en la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado un sensor óptico para la determinación de ácido tenuazónico (TeA) en muestras de alimentos empleando un MIP luminiscente como elemento de reconocimiento selectivo. El principio de medida se basa en la formación de un complejo fosforescente de Eu(III) con los monómeros funcionales empleados en la síntesis del MIP y el TeA. La micotoxina se emplea como ligando antena y el complejo formado presenta una intensa emisión a 615 nm.

Debido al alto coste de la micotoxina comercial, los miembros del grupo de investigación pertenecientes al Dpto. de Química Orgánica de la Universidad Complutense optimizaron una ruta sintética para la obtención de TeA libre para su empleo en la síntesis, optimización y aplicación del MIP. Seguidamente, se sintetizó una librería de polímeros en formato de mini-MIPs variando la estequiometría entre los monómeros funcionales, basados en β -dicetonas y la molécula plantilla, así como el iniciador utilizado. Los dos MIPs que presentaron mejores características sensoras frente a TeA se sintetizaron en formato de microesferas porosas a fin de reducir los tiempos de respuesta. A continuación, se optimizaron las condiciones de medida, evaluando las características analíticas de ambos materiales y su selectividad cruzada frente a otras micotoxinas, a fin de seleccionar la composición óptima para el desarrollo del sensor. Finalmente se aplicó el MIP seleccionado al análisis de extractos de arroz fortificados con TeA para la evaluación de su aplicabilidad en el análisis de muestras de alimentos.

Las etapas de las que consta este trabajo se pueden resumir en:

1. Síntesis y evaluación de la librería de MIP/NIPs selectivos a TeA.
2. Síntesis de los MIP/NIPs óptimos en formato de microesferas porosas.
3. Optimización de las condiciones de medida con el sensor luminiscente basado en MIPs.
4. Evaluación de las características analíticas de los polímeros seleccionados.

5. Análisis de extractos de arroz fortificados con TeA.

Molecularly Imprinted Polymer Based Sensor Containing Europium (III) Ions for Tenuazonic Acid Determination in Food Samples

A. Rico-Yuste,^a R.A.G. Abou-Hany,^b J.L. Urraca,^a A.B. Descalzo,^b G. Orellana,^{b,*} M.C. Moreno-Bondi.^{a,*}

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense, s/n, 28040 Madrid, Spain.

^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense, s/n, 28040 Madrid, Spain.

* Corresponding authors: M.C. Moreno-Bondi, Fax: (+) 34 913944329, E-mail: mcmbondi@ucm.es; G. Orellana, E-mail: orellana@ucm.es

In Preparation

Abstract

Tenuazonic acid (TeA) is a well known mycotoxin produced mainly by *Alternaria* species that can be found in several foodstuffs. In this article, we describe the synthesis of molecularly imprinted porous polymer microspheres, doped with Eu(III), for the selective analysis of TeA in food samples. The TeA template molecule, bearing a β -diketone group, is a good chelating Eu(III) antenna ligand that can be selectively captured in the MIP cavities and detected directly by observing the sensitized luminescence of the Eu(III) ions at 615 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 337$ nm). A comprehensive library of polymers was prepared at small scale using two different functional monomers, diethyl allylmalonate (DEAM) or allyl acetoacetate (AACA), mixed at different ratios with the template, and using ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker. Polymer screening allowed the selection of P(DEAM-*co*-EDMA) with Eu(III) as luminescent metal center for sensor development. Under the optimized conditions, a linear response to TeA was obtained in the 2.6 – 20 mg·L⁻¹ range, with a detection limit of 0.8 mg·L⁻¹. The novel Eu(III)-doped MIPs are highly selective to TeA, and no cross-reactivity has been observed from other mycotoxins present in foodstuff, such as alternariol, β -zearalenol and cyclopiazonic acid. MIPs have been successfully applied to the analysis of diluted rice extracts spiked with TeA and the results have been validated by HPLC-DAD.

7.5.1. Introduction

Tenuazonic acid ((5S,8S)-3-acetyl-5-sec-butyltetramic acid, TeA) is a mycotoxin produced mainly by *Alternaria* genus fungi and different species of *Phoma* and *Magnaporthe* genus.¹ *Alternaria* fungi can produce other mycotoxins such as alternariol (AOH) or alternariol monomethyl ether (AME) but TeA is the most toxic, showing carcinogenic, cytotoxic and phytotoxic properties.² In fact, it is considered a powerful inhibitor of protein biosynthesis on ribosomes by suppressing the release of new proteins and provokes acute toxicity in mammals. Although there is not legislation about its content in food commodities, the EFSA (European Food Safety Authority) is aware about its risks for human health. Therefore, accurate methods for the analysis of these mycotoxins are necessary in order to minimize human exposure.³

Nowadays mycotoxins are analyzed by liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry (MS/MS). Previous extraction and clean-up of the samples is necessary due to the complexity of matrixes. The most extended method for TeA extraction is known as QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)^{4,5} or modified methods based on this principle of phase separation induced by inorganic salts.^{6,7} Another alternative is the extraction with different solvent mixtures such as acetonitrile/water, with or without acid, followed by solid-phase extraction (SPE)⁸ or by injecting directly after dilution with an appropriate solvent (Dilute and Shot, DnS).^{9,10} The levels of TeA in different food commodities have been found to range from $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ to $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.^{9,11} The analysis of TeA in food samples can be carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) in combination with UV absorption detection. However, these methods, require complexation with Zn(II), to avoid the irreproducible chromatographic behavior, which is not compatible with mass spectrometry (MS).¹² In order to improve MS detection of TeA some authors have described the derivatization using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH).^{13,14} However, the synthesis of isotopic labeled standards has displaced derivatization techniques, using instead stable isotope dilution assay (SIDA) for TeA analysis.^{15,16}

All the above mentioned methods require optimization for each matrix and qualified personal is needed to operate expensive and sensitive equipment. To overcome

these problems, the development of cheaper and more accessible methods is necessary. In this lone, a lateral flow immunoassay method has been recently reported for the analysis of TeA in food samples.² The disadvantage of this method is the use of antibodies which are expensive.

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are tailor made synthetic materials used for the selective recognition of molecules. These polymers are synthesized in presence of a template molecule generating specific binding sites with a shape and geometry of functional groups complementary to those present in the template molecule.¹⁷ Most MIPs are synthesized following the non-covalent approach, that is, by relying in non-covalent interactions such as hydrogen bonding or electrostatic for template binding. Another interesting approach is based on metal-ligand coordination.¹⁸ The interaction of the functional monomer –the monomer in charge of template binding– and the template are strengthened because metal ions work as an assembly pivot that organizes the functional monomer and the template during the prepolymerization step.¹⁹ The selection of the metal mediator is an important issue. It is possible for example to prepare photo-emitting materials by using rare earth cations as the metal center.²⁰ Rare earth complexes with β -diketone ligands have attracted considerable attention because of their high and sharply spiked fluorescence emission efficiency, long emission lifetime and large Stokes shifts.²¹ Since the absorption coefficient of the Ln(III) ions themselves is very low, at least, one of the ligands must be a chromophore acting as an antenna. That is, it must be able of efficiently absorb light and transferring it to the metal center, which is then able to emit a luminescent signal. The observation of the sensitized luminescence upon coordination of a certain organic chromophore can be used for detection of the sensitizer molecule. A few examples can be found in the literature describing this approach: the detection of β -diketone ligands, such as the fluoroquinolone antibiotic enrofloxacin²² or the chlorinated herbicide picloram²³ that are able of inducing an increase of Eu(III) luminescence upon coordination within the MIP cavities.

In this work, we report the synthesis of a luminescent sensor based on an Eu(III) ion-doped molecularly imprinted polymer for the selective detection of tenuazonic acid. The Eu(III)-MIP is synthesized in the format of porous microspheres that are obtained using porous silica microspheres as scaffold. The polymers are prepared using non-

chromophoric β -diketone ligands as functional monomers for Eu(III) coordination and for polymerization, and in the presence of a synthetic TeA as the template molecule, which can form a chelate complex with the Eu(III) metal centers. The resulting Eu(III) imprinted polymer showed a significant luminescence only after binding the tenuazonic acid β -diketone chromophore.

7.5.2. Experimental

7.5.2.1. Materials and chemicals

Ethylene glycoldimethacrylate (EDMA), L-isoleucine methyl ester hydrochloride, triethylamine (Et_3N) and sodium methoxide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diethyl allylmalonate (DEAM), allyl acetoacetate (AACA), europium chloride hydrate (EuCl_3) and ammonium hydrogen difluoride (NH_4HF_2) were obtained from Alfa-Aesar (Karlsruhe, Germany). The initiators *N,N*-azobis-(2,4-dimethyl)valeronitrile (ABDV) and 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) were purchased from Wako (Neuss, Germany) and used as received. *m*-xylene and trifluoroacetic acid (TFA) (HPLC-grade, 99%) was from Fluka (Buchs, Switzerland), whereas hexane, hydrochloric acid (HCl), methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) (all HiPerSolv Chromanorm HPLC grade) were from VWR International (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide (NaOH) was from Scharlau (Badalona, Spain). Water was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). The monomers were purified, as required, by chromatography immediately before use with an inhibitor-remover stationary-phase from Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

7.5.2.2. Optical spectroscopy

UV-VIS absorption spectra were recorded with a Varian Cary 3-Bio spectrophotometer. Phosphorescence emission measurements were carried out on a Cary Eclipse (Varian) spectrofluorometer with a Xe flash lamp, using a delay for detection of 30 μs with respect to the pulse of the lamp. The excitation wavelength was always set at 330 nm.

7.5.2.3. Synthesis of tenuazonic acid

The synthesis of (5S,8S)-3-acetyl-5-sec-butyltetramic acid was performed in two steps. First, for the synthesis of methyl N-acetoacetyl-L-iso-leucinate, L-isoleucine methyl ester hydrochloride (1.00 g, 5.39 mmol) was dissolved in 5.39 mL of *m*-xylene, and Et₃N (0.75 mL, 5.39 mmol) was added to the mixture. After complete dissolution, 2,2,6-trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one (4.00 mL, 30 mmol) was added dropwise during 30 min at room temperature and heated at 138 °C for 5 h. The reaction mixture was filtered when it was still hot, and, after cooling down, the resulting solid was washed with diethyl ether. The solvent was evaporated giving an oily compound in 99% yield that was immediately used after preparation without further characterization.

In the second step, for the preparation of (5S,8S)-3-acetyl-5-sec-butyltetramic acid, a 3.3 mL of a sodium methoxide solution in methanol (58 mmol) were added to 10 mL of dry MeOH containing methyl N-acetoacetyl-L-iso-leucinate (5.8 g, 27.2 mmol), and heated at 65 °C for 4 h. Solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in 20 mL of water and washed with diethyl ether (3 × 20 mL). Aqueous layer was acidified with 1M HCl and extracted with diethyl ether (3 × 20 mL) and ethyl acetate (20 mL). Finally, organic layers were collected together and washed with 1 HCl and water. After drying over MgSO₄, solvent was evaporated under reduced pressure. Yield: 71%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃-d₁) δ: 0.95 (m, 6H), 1.28 (m, 2H), 1.97 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 3.80 and 3.92 (d, 1H), 6.60 and 6.70 (s b, 1H) ppm; FT-IR: 3247, 2963, 2932, 1712, 1611, 1563, 1377, 1212 cm⁻¹; MS-ESI (negative), *m/z*; calculated for C₁₀H₁₄NO₃, [M-H]⁻: 196.1; found: 195.8.

7.5.2.4. Combinatorial MIP library preparation and evaluation

Two functional monomers, DEAM and AACA, were used to create the MIP/NIP libraries. The composition of each MIP was varied in terms of template (T):functional monomer (FM) molar ratio and radical initiator. Different T:FM ratios were tested, namely 3:1, 2:2 and 1:3 according to the amounts displayed in Table 1. The amount of EuCl₃, EGDMA and radical initiator was kept constant for the whole series, fixing a molar ratio of EuCl₃:EGDMA at 1:28. The volume of porogen (EtOH:2M NaOH; 20:1; v/v) for each polymer synthesis was calculated in such a way that the $V_{\text{porogen}}/(V_{\text{porogen}} +$

$V_{\text{total monomers}}$) ratio was kept at ~ 0.57 . Non-imprinted polymers (NIPs) were prepared in the same way, but without adding the template to the monomer mixture.

The polymers were synthesized in 2 mL 96-well polypropylene plates (Radleys) following the compositions shown in Table 1. Stock solutions of the components (monomers, initiator, template) were transferred into the wells and left equilibrating for 15 min at room temperature to allow for the monomer-template interaction to occur. Finally, the chosen radical initiator (ABDV or AIBN) and the cross-linker (EGDMA) were added to each well. The 96-well plates were purged with nitrogen for 5 min and sealed with PTFE-coated lids (Radleys, UK). Then, they were placed into an oven for one day at 50 °C and a second day at 70 °C. The bulk polymers obtained in this way were ground with an agate mortar and the grains were transferred to another 2 mL per well 96-well plate containing a 10 μm polypropylene porous membrane per well.

Table 1. Amounts of template, functional monomers (DEAM or AACA) and radical initiator (ABDV or AIBN) used for the preparation of the Eu-MIP library. The amount of $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (66 μmol) and cross-linker EGDMA (1880 μmol) were kept constant for the whole series.

Polymer	TeA (μmol)	DEAM (μmol)	AACA (μmol)	ABDV (μmol)	AIBN (μmol)	EtOH : 2M NaOH (20:1; v/v) (μL)
MIP 1	198	66		44		488
MIP 2	132	132		44		506
MIP 3	66	198		44		524
MIP 4	198		66	44		483
MIP 5	132		132	44		496
MIP 6	66		198	44		507
MIP 7	198	66			67	488
MIP 8	132	132			67	506
MIP 9	66	198			67	524
MIP 10	198		66		67	483
MIP 11	132		132		67	496
MIP 12	66		198		67	507

The microbeads were washed with a mixture of MeOH/HCl (9:1; *v/v*) until complete template removal as checked by phosphorescence measurements. Non-imprinted polymers (NIPs) were treated in the same way. During the process of template removal, part of the Eu(III) centers were also washed out, therefore, an additional step for Eu(III) reincorporation was necessary before proceeding with the characterization of the polymers. For the reincorporation of Eu(III) MIPs and NIPs were suspended in 0.8 mL of EtOH and the calculated amount of 2 M NaOH was added according to the ratio of the functional monomer in the polymer. After that, 332 μL of a solution of EuCl_3 in EtOH (0.341 M) was added to each polymer. This mixture was shaken at 50 °C for 4h and washed with water and MeOH. Finally, powder was dried under vacuum at 45 °C.

The recognition ability of the MIP/NIP library was investigated by using luminescence spectroscopy measurements after 24 h of incubation with TeA (2 mL of a solution of 12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TeA in ACN was added to each polymer). The luminescence of each suspension was measured at 615 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm) and compared with emission of the corresponding MIP or NIP incubated in the absence of TeA. The relative values of luminescence intensity obtained for each MIP/NIP pair are represented in Figure 2. The results show that the best T:Eu:FM ratio was 1:1:3, using either DEAM as functional monomer and ABDV as radical initiator. Therefore, such combination was selected for the subsequent synthesis of the polymer beads. Also, a 1:1:3 mixture using AACA as FM was tested for the preparation of the microbeads.

7.5.2.5. Polymerization into silica beads

For the synthesis of the MIPs in porous microsphere format, a solution of 2 M NaOH (0.75 mmol) was added to a solution of 0.75 mmol of functional monomer, DEAM (for MIP P1) or AACA (for MIP P2) in 0.349 mL of EtOH. An ethanol solution of EuCl_3 (0.25 mmol in 2 mL) was added over this mixture, and, after complete dissolution, a solution of TeA (0.25 mmol) in 2 mL of EtOH was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for two hours for allowing the formation of the Eu(III)-FM-TeA complex. Finally, EDMA (3.75 mmol) and ABDV (3% of the total weight of monomers) were added. Then, 3.6 g of the silica microbeads were placed in a 50 mL glass vial and were mixed by stirring with the cocktail solution until the silica beads were

freely flowing. The vial was sealed with a septum and purged with N₂ for 5 min. The mixture was left to polymerize 24 h at 60 °C. The resulting composite was shaken for 24 h with an aqueous solution (3 × 140 mL) of 3 mol L⁻¹ NH₄HF₂. The polymer particles were washed with water (until pH ~7), MeOH/TFA (99:1, *v/v*) (50 mL) and MeOH (250 mL). Finally, the beads were sedimented using MeOH/water (80:20, *v/v*) in order to remove fine particles in the supernatant, followed by drying at 50 °C in a vacuum oven for 24 h. The resulting polymers were washed by using a mixture of MeOH/HCl (9:1; *v/v*) until removal of the template (shaking 1 h at room temperature each time, and separation of the solids by centrifugation). The solid was finally dried in a vacuum oven at 45 °C.

Reincorporation of the Eu(III) cation into the polymer matrix was performed by mixing a solution of EuCl₃ (34 mmol) in 1.72 mL of EtOH with a suspension of extracted beads (600 mg) in 50 mL of EtOH containing NaOH (1 mmol). The reaction mixture was incubated 16 h at 70 °C with shaking. Polymers were isolated by centrifugation, washed with water and MeOH, centrifuged, and dried under vacuum at 45 °C. Non-imprinted polymers were prepared in the absence of the template molecule and treated in the same way and the MIPs.

7.5.2.6. HPLC-DAD analysis

Chromatographic analysis was done on a HP-1100 HPLC instrument from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an on-line degasser, an autosampler, an automatic injector, a column thermostat and a diode array detection system (DAD). Chromatographic separation were performed on a LUNATM C18 (polar encaped) HPLC column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The method used was based on that described by S. da Motta *et al.* with modifications ¹². The mobile phase was passed according to a gradient where solvent A (Milli-Q water with 0.73 g of zinc acetate) and solvent B (MeOH) were used as follows: 10 % B (5 min, 1 mL·min⁻¹), 10-50 % B (5 min, 1 mL·min⁻¹) and 50 % B (5 min, 1 mL·min⁻¹). Then, the initial conditions (1 mL·min⁻¹) were maintained for 5 min prior to the next injection. The column temperature was kept at 25 °C. Prior the analysis 500 μL of sample were mixed with 500 μL of mobile phase A. The injected volume was 50 μL and TeA eluted within 10.3 min. The UV detector wavelength was set

at 280 nm. Linear calibration graphs were obtained in the 20–8000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ range for tenuazonic acid ($r \geq 0.9999$).

7.5.2.7. MIP sensor calibration

2 mg of polymer were weighted in a 15 mL polypropylene tube and suspended in 3 mL of the TeA containing sample. After 1h of incubation, suspensions were filtered through a 96-well 0.45 μm PTFE MultiScreen® Solvintert filter plate (Merck Millipore, Tullagreen, Ireland). 500 μL of ACN were added to each well in order to re-suspend the polymer and after 5 min ACN was discarded by filtration until the polymer was dry. After 30 min at room temperature, the plate was read in a microplate reader (BMG LABTECH CLARIOstar, Ortenberg, Germany) in the time resolved mode with an Ex-TR (337 nm) excitation filter, a LP-TR dichroic filter, and a 615 nm emission filter. Delay was set at 30 μs , integration time was 1 ms, gain was 534, and focal height was set at 3.3 mm, after experimental optimization.

7.5.2.8. Sample analysis

Sample extraction was done following the method reported by Walravens et al.⁶ with some modifications. Rice samples were thoroughly ground using the M20-grinder (Ika Werke, Staufen, Germany). Before weighing, the ground material was vigorously homogenized. Homogenized samples ($2.5000 \text{ g} \pm 0.0025$) were extracted for 60 min with 10 mL of ACN and, after incubation, they were centrifuged (10 min, 3600 rpm). Supernatants were filtered by using a 0.45 μm Nylon syringe filter and combined with 4 mL of hexane to defat for 30 min. Sample extracts were centrifuged (10 min, 3600 rpm) and the upper hexane layer was removed. Final extracts (3 mL) were spiked with the corresponding amount of TeA standard and 1 mL of ACN.

7.5.3. Results and discussion

7.5.3.1. Template preparation

Several methods have been described in the literature for the preparation of TeA ((S)-3-acetyl-5-(S)-*sec*-butyltetramic acid).²⁴⁻²⁷ The route involving a Dieckmann intramolecular cyclisation, –a base-catalyzed intramolecular reaction of diesters to give a β -ketoester after C-acetylation of N-acyl amino esters–, is generally favored because of

its swiftness yet it yields variable degrees of racemization. Following this approach, some reported synthesis of tenuazonic acid (as a mixture of the R and S enantiomers) involves *N*-acetoacetylation of the α -amino group of the methyl ester of L-isoleucine with diketene using *m*-xylene as the solvent.^{26,27} This reaction provides the *N*-acetoacetyl amino acid ethyl ester, which is then cyclized in the presence of a base – sodium methoxide– in methanol to yield the tenuazonic acid.²⁵ In this work (Figure 1), the methods of Wang et al.²⁵ and Asam et al.²⁶ with some modifications were followed. For *N*-acetylation we used 2,2,6-trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one instead of diketene because it has been described to be a more convenient acetoacetylation agent than diketene itself.^{28,29} This compound is a diketene-acetone adduct that is stable at room temperature and releases diketene slowly during heating. This reagent allowed us to obtain the tenuazonic acid with a reaction yield exceeding 75%. Due to the use of a strong base such as NaMeO under heating in the last cyclization step, the compound is obtained as a mixture of the 5R and 5S isomers.³⁰

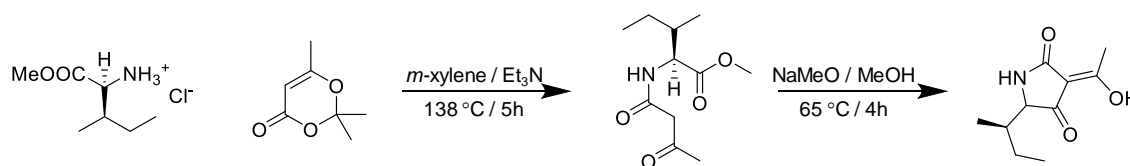


Figure 1. Synthesis of tenuazonic acid

7.5.3.2. Choice of the polymer

A combinatorial MIP/NIP library was prepared (see section 7.5.0 and Table 1 for details) by employing two different functional monomers (DEAM or AACA) combined in different molar ratios with TeA and two different radical initiators (ABDV or AIBN. T:FM molar ratios employed were 3:1, 2:2 and 1:3, while the Eu(III):CL ratio was fixed to 1:28 in all cases. For the NIP syntheses, the same FM:Eu(III):CL ratio was employed, but in the absence of template.

The recognition ability of the MIP/NIP library was investigated as described in section 7.5.0. Figure 2 shows that 1:3 was the best molar ratio of TeA:FM for the different functional monomers and initiators. This ratio renders the strongest binding of TeA with MIPs in ACN. Moreover, such combination provides the maximum difference between the binding with the corresponding MIP and NIP pair. Based on these results, the

composition of the pre-polymerization mixture employed for the synthesis of MIP 3 and MIP 6 was chosen for a large-scale synthesis of MIP porous microbeads.

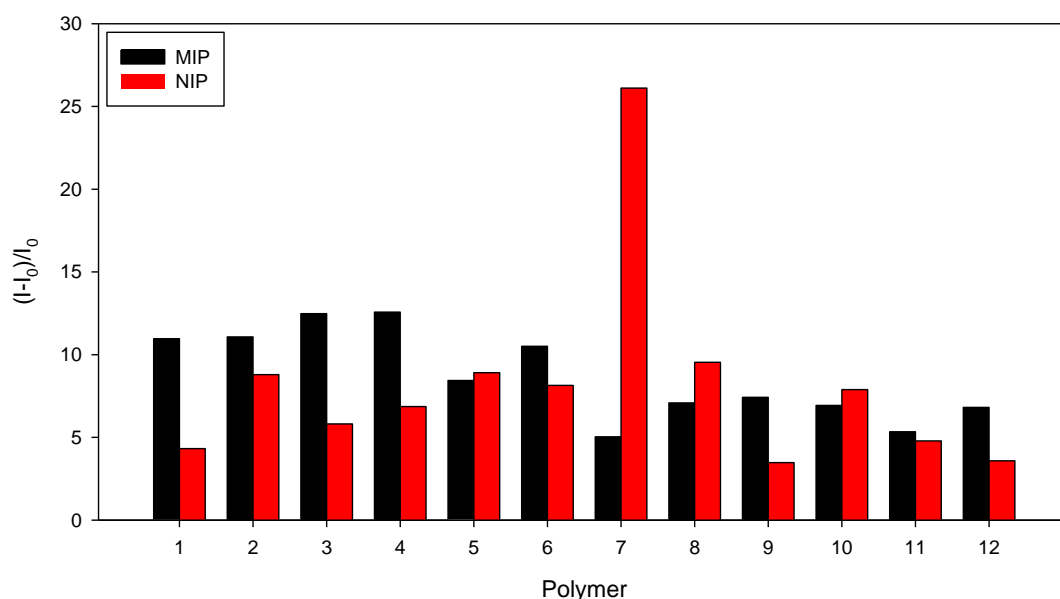


Figure 2. Relative increase of the luminescence intensity $(I-I_0)/I_0$ of different polymer suspensions after incubation with $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of TeA in ACN. The code of the polymers is shown in Table 1. In black the MIPs and in red, the corresponding non-imprinted polymers.

7.5.3.3. Synthesis of MIP and NIP porous microbeads

The functional monomer (DEAM or AACA) and the compositional ratio that yielded MIPs with the best recognition of TeA (see above) were used for the preparation of porous MIP microbeads. Two types of polymers were synthesized, using DEAM or AACA as functional monomers. The final molar composition was 1:1:3:15, with TeA:Eu(III):DEAM:EDGMA for MIP P1, and TeA:Eu(III):AACA:EDMA for MIP P2.

The microspheres were prepared by filling the pores of commercial 40–75 μm diameter silica beads with the pre-polymerization mixture. The silica scaffold acts as a mould during the polymerization process, in a way that, after silica dissolution with NH_4HF_2 , void channels are created in the resulting MIP bead structure³¹. These channels accelerate mass transfer kinetics of the target analyte to the recognition sites into the beads with respect to bulk MIPs. The highly porous MIP/NIP spheres obtained are roughly the same size than the initial silica beads (see SEM picture on Figure 3).

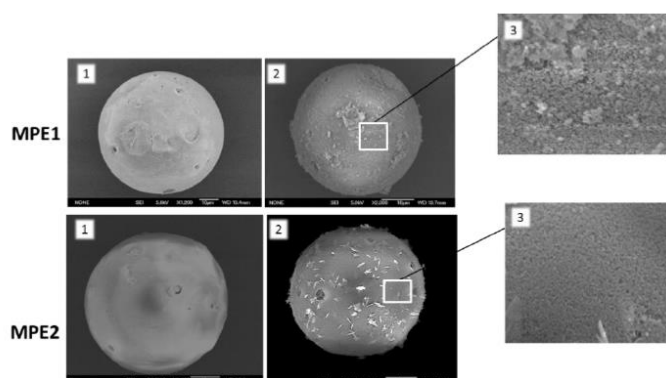


Figure 3. SEM images for MIP P1 and MIP P2 spherical particles before (1) and after (2) silica etching (10 μm scale bar); (3) shows a zoom of the corresponding images in (2).

7.5.3.4. Assay optimization

Several parameters influencing the response of the polymer performance, namely, the content of water in the solvent employed for incubation with TeA, the incubation time, the polymer composition and the volume of the washing solvent, were first optimized.

Influence of water concentration in the incubation solvent

The influence of water content in the solvent that should be employed for incubation with TeA was evaluated by following the changes in emission intensity for both the MIP/NIP P1 and MIP/NIP P2 pairs in the presence of TeA in function of the water concentration in water-ACN mixtures. Rebinding studies with TeA were performed by increasing the amount of ACN in water as follows: 5, 25, 50, 80 and 100% ACN (*v/v*). Equal amounts of TeA (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) were added to the MIP/NIP P1 and MIP/NIP P2 suspensions in the different water-ACN mixtures. The strongest increase in the luminescence signal at 615 nm upon addition of TeA was observed in 100% ACN suspensions (Figure 4). It is described in bibliography that the Eu(III) emission band at 615 nm is a hypersensitive transition that reveals changes of the coordination sphere of the metal centre. The presence of coordinated water molecules for example, tends to quench the luminescence due to non-radiative processes.^{32,33} Additionally, it is expected that TeA-Eu(III) coordinative interaction will be stronger in the less competitive acetonitrile solvent, than in the aqueous mixtures. The stronger polymer-TeA interaction is expected to yield a more intense luminescence signal in neat ACN as observed in

Figure 4. Consequently, 100% acetonitrile was chosen as the optimum incubation solvent for further experiments

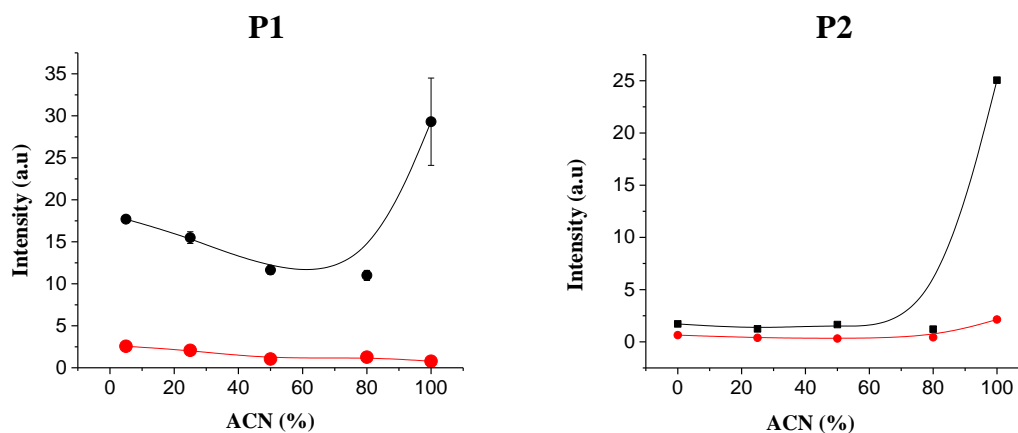


Figure 4. Intensity of the luminescence signal at 615 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm) for suspensions of MIP P1/P2 (black) and NIP P1/P2 (red) ($c_{\text{suspensions}} = 0.67$ mg·mL⁻¹) after the addition of 10 mg·L⁻¹ TeA upon increasing %ACN in water-ACN mixtures (incubation time 1 h, 25 °C, n = 3).

Incubation time

The effect of the incubation time in standard solutions of TeA (2 mg·L⁻¹ in ACN) on the polymers emission at 615 nm is shown in Figure 5. The emission intensity of the MIPs increases with the incubation time in both cases, MIP P1 and MIP P2, at different rates. For MIP P1, the maximum increment of emission was reached at 60 min, whereas only 15 min were needed in the case of MIP P2. Differences on binding kinetics could be related to the different functional monomers used. Though functional groups coordinating with the metal ion are the same, polymerizable groups are in different positions. This might lead that the arrangement of the monomers around metal ion might affect the morphology of the binding sites. As a compromise for both type of polymers, 60 min was chosen as the optimum incubation time for further experiments. The response of the NIPs was very low, as is expected due the absence of the imprinting process.

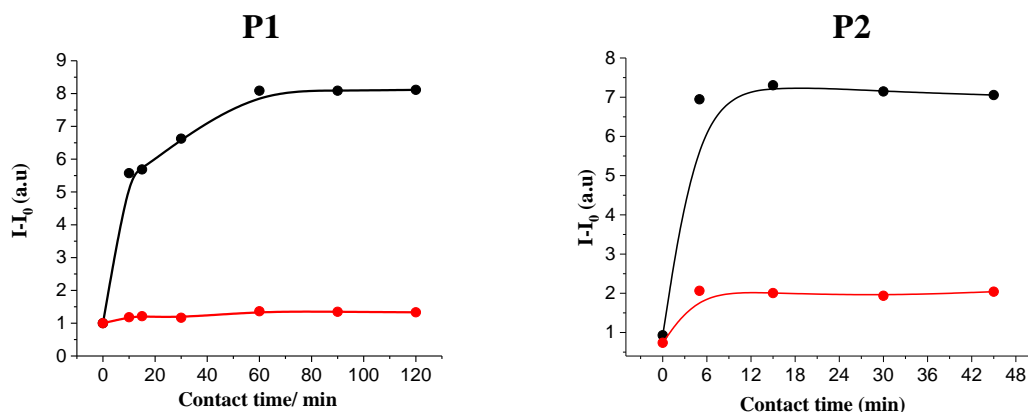


Figure 5. Intensity of the luminescence signal at 615 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm) for suspensions of MIP (black) and NIP (red) ($C_{\text{suspensions}} = 0.67$ mg·mL⁻¹), after the addition of 2 mg·L⁻¹ TeA at different incubation times.

Polymer composition

In order to select the best candidate for the analysis of TeA the calibration curves with polymers MIP P1 and MIP P2, and their respective NIPs, were prepared by incubating the microbeads in 3 mL of TeA solutions with concentrations ranging from 0 to 30 mg·L⁻¹, prepared in ACN, as described in section 7.5.0 (Figure 6).

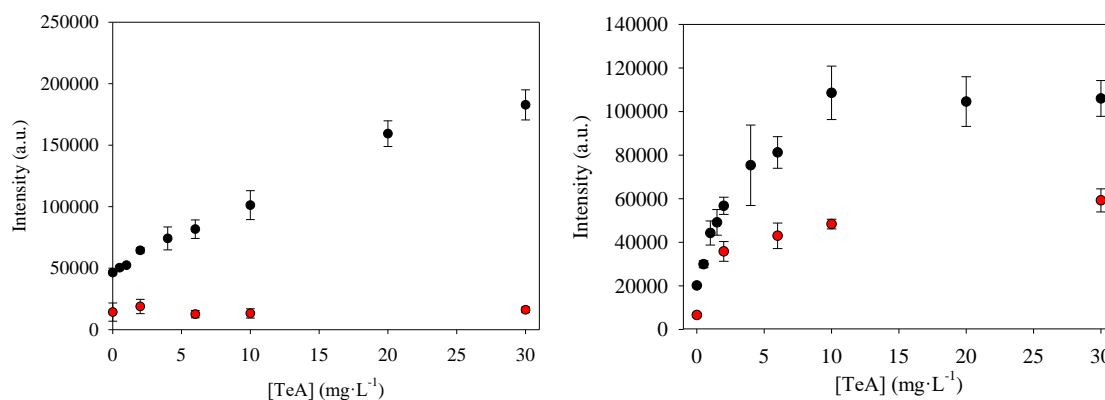


Figure 6. Representative calibration plot of MIP P1 (left) and MIP P2 (right) after incubation with TeA in ACN ($n = 3$; $\lambda_{\text{ex}} = 337$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 615$ nm). MIPs are represented in black and their corresponding NIPs in red.

The polymers prepared with DEAM (MIP P1) showed higher luminescent signals in the presence of TeA than those prepared with AACA (MIP P2), reaching saturation for a mycotoxin concentration of 30 mg·L⁻¹ and 10 mg·L⁻¹ for MIP P1 and MIP P2, respectively. In addition, the non-imprinted polymers (N1) showed a negligible and constant response in all the concentration range, therefore non-specific binding could be discarded. However, NIP P2 showed non-specific binding and the luminescent signal

increased with the concentration of TeA in the sample, although the saturation was reached at lower concentrations than with the MIP. On the other hand, MIP P2 also showed lower reproducibility between assays than MIP P1. Therefore, the latter was selected for further experiments.

Washing solvent volume

As discussed in section 0, the presence water must be avoided to obtain an intense luminescence signal in the presence of TeA, therefore we rule out the use of ACN/water mixtures, usually applied as washing solvents to reduce non-specific binding and wash out the matrix interferents, for sensor development.³⁴ Instead, different volumes of ACN (250, 500 and 1000 μL) were evaluated for the washing step and to ensure homogeneous microspheres deposition at the bottom of the well plate. Results are shown in Figure 7.

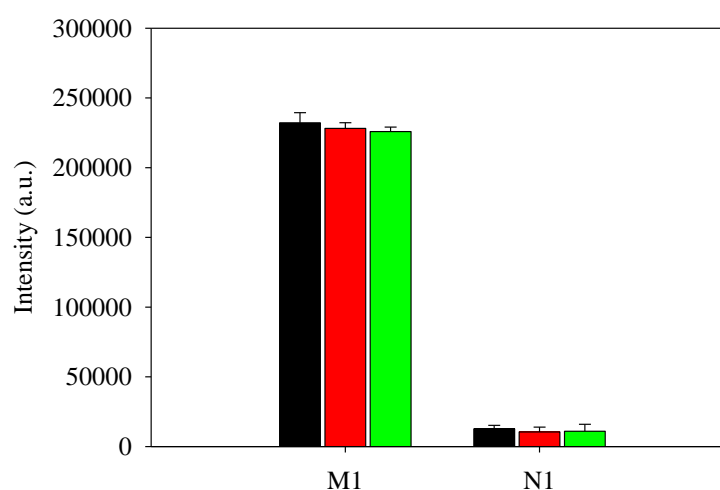


Figure 7. Luminescence intensity of the MIP P1 and NIP P1 after incubation with $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of TeA in ACN, using a washing step with 250 (black), 500 (red) and 1000 (green) μL of ACN as described in section 7.5.2.7. ($n = 3$, $\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$).

There were not significant differences between the response in either the MIP or the MIP using different ACN volumes in the washing step. Finally, 500 μL were selected for further experiments

7.5.3.5. Analytical characterization

The sensing polymers were incubated in 3 mL of ACN, containing TeA at concentrations ranging from 0 to 30 mg·L⁻¹. A linear response was obtained in the range from 0 to 20 mg L⁻¹ ($n = 3$; $r^2 = 0.994$; Figure 8), with a limit of detection of 0.8 mg L⁻¹ and a limit of quantification of 2.6 mg L⁻¹, calculated as three and ten times the standard deviation of the blank measurements, respectively.

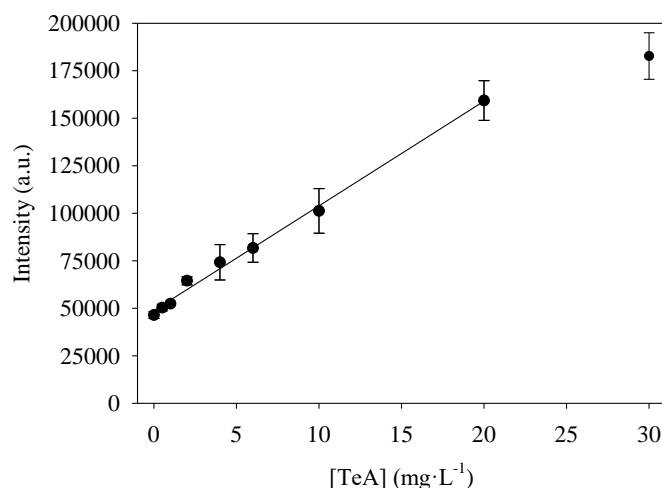


Figure 8. Representative calibration plot of the response of MIP P1 versus TeA concentration in ACN at the linear range ($n = 3$, $\lambda_{\text{ex}} = 337$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 615$ nm)

Polymer selectivity was evaluated in the presence of other mycotoxins typically found in food samples, namely cyclopiazonic acid (CPA), alternariol (AOH) and β -zearalenol (β -ZOL) (0 – 30 mg·L⁻¹; Figure 9A). Results shown in Figure 9B reveal that only CPA induced some MIP response but below the limit of quantification of the sensor and its response is constant at all the concentration tested. This behavior could be explained by the similar structure of both compounds. CPA also belongs to the group of tetramic acids, therefore it bears a β -diketone group in its structure, which is the responsible of the interaction with the Eu(III). However, the size of CPA is higher than that of TeA therefore, in principle it could not enter in the specific binding sites, showing the benefits of the imprinting process. In the case of AOH and ZOL, there are not structural similarities to induce some response and the measured signal is the similar to the blank.

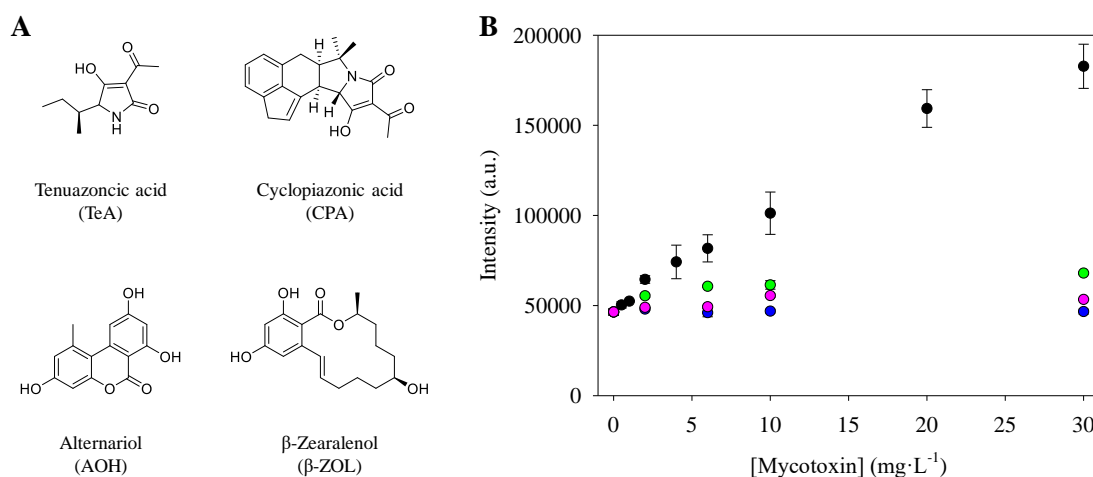


Figure 9. A) Structure of the molecules used for cross selectivity experiments. B) Evaluation of the cross-sensitivity of M1 in the presence of TeA (black), CPA (green), AOH (blue) and β-ZOL (pink). (n = 3; λ_{ex} = 337 nm, λ_{em} = 615 nm).

7.5.3.6. Sample analysis

The TeA selective MIPs were applied to the analysis of the mycotoxin in rice extracts (Section 0). In order to investigate potential matrix effects, the rice extracts (3 mL) previously checked not to contain the mycotoxins at levels above the detection limits of the proposed method, were spiked with TeA (6 mg·L⁻¹) and diluted with ACN (1 mL). The samples were analyzed using the optimized procedure (Sections 7.5.2.7 and 7.5.2.8.). A calibration plot (matrix matched calibration, MMC) was built using rice extracts diluted with ACN with increasing concentrations of TeA ranging from 0 to 12 mg·L⁻¹ and measured using the procedures described above. No statistically significant differences were observed between the calibration plots obtained in neat ACN and in the diluted rice extracts below 6 mg·L⁻¹, demonstrating the applicability of the sensor for real sample analysis (Figure 10). Above this concentration, saturation was reached and the signal remained constant. This could be explained considering that the matrix component block the TeA specific binding sites avoiding further retention of the target mycotoxin. However, this should not be a problem as the concentrations typically found for TeA in this type of samples are below this concentration level.

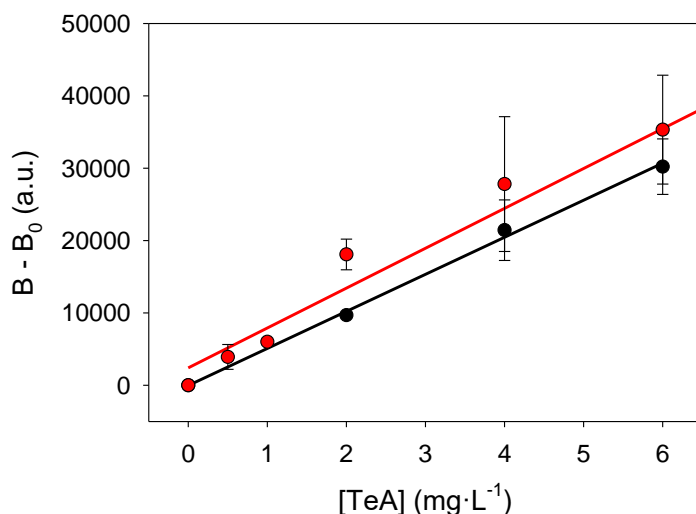


Figure 10. Evaluation of the matrix effect on the Eu-doped MIP response. Sample solutions: (red) ACN (external calibration, EC) and (black) rice extract diluted (1:3) with ACN (Matrix matched calibration, MMC) ($n = 3$; $\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$).

For validation purposes, a sample spiked with $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TeA ($n = 3$) was analyzed using the optimized method and HPLC-DAD. The results, shown in Table 2, confirmed that no statistically significant differences were observed between the results obtained by both methods, demonstrating the performance of optimized MIP-based sensor for the analysis of TeA in food samples.

Table 2. Method validation ($n=3$).

[TeA] added ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	HPLC-DAD		MIP – EC		MIP - MMC	
	[TeA] found ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)	[TeA] found ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)	[TeA] found ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)
5	(4.98 ± 0.09)	1	(4.9 ± 0.6)	5	(5.7 ± 0.7)	5

* ts/ \sqrt{n} ; EC: External calibration; MMC: Matrix matched calibration

7.5.4. Conclusions

In summary, we have developed a novel MIP sensor, based on the luminescence of Eu(III) chelates, for the analysis of tenuazonic acid (TeA) in food samples. A new route for TeA synthesis has been also reported with better yields than those described in bibliography. Benefitting from the antenna effect of the β -diketones coordinated to Eu(III), TeA binding induces a phosphorescence enhancement, allowing the optical

determination of the mycotoxin. Besides, the use of phosphorescence avoids the scattering and long acquisition times allows to increase the collected signal, increasing the sensitivity. The optimized method allows selective determination of TeA with excellent reproducibility, sensitivity and specificity. Furthermore, a low detection limit of $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and linearity between $2.6 - 20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ range can be achieved. Although, LOD and LOQ are far away from current methods based on mass spectrometry, this work may open up new pathway for luminescence determination of TeA in food samples. The proposed system allows for the testing of multiple samples in a single reading, reducing analysis times considerably. To the best of our knowledge is the first MIP synthesized for TeA recognition and the first sensor platform for its determination.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant CTQ2015-69278-C2-R/AIE). ARY and RAGAH thank MIECO for a FPI predoctoral grant.

References

1. R. C. Oliveira, S. S. Goncalves, M. S. Oliveira, P. Dilkin, C. A. Mallmann, R. S. Freitas, P. Bianchi, B. Correa, *Food Chemistry*, 2017, **230**, 491-496.
2. D. Kong, L. Liu, S. Song, Q. Zheng, X. Wu, H. Kuang, *Food and Agricultural Immunology*, 2017, **28**, 1293-1303.
3. L. P. Prendes, A. R. Fontana, M. G. Merín, A. D' Amario Fernández, R. Bottini, M. L. Ramirez, V. I. Morata de Ambrosini, *Food Science & Nutrition*, 2018, **6**, 523-531.
4. A. R. Fontana, L. P. Prendes, V. I. Morata, R. Bottini, *RSC Advances*, 2016, **6**, 95670-95679.
5. J. Zhou, J.-J. Xu, Z.-X. Cai, B.-F. Huang, M.-C. Jin, Y.-P. Ren, *Journal of Chromatography B*, 2017, **1068-1069**, 15-23.
6. J. Walravens, H. Mikula, M. Rychlik, S. Asam, E. N. Ediage, J. D. Di Mavungu, A. Van Landschoot, L. Vanhaecke, S. De Saeger, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1372**, 91-101.
7. P. López, D. Venema, T. de Rijk, A. de Kok, J. M. Scholten, H. G. J. Mol, M. de Nijs, *Food Control*, 2016, **60**, 196-204.

8. A. Prella, D. Spadaro, A. Garibaldi, M. L. Gullino, *Food Chemistry*, 2013, **140**, 161-167.
9. S. Hickert, M. Bergmann, S. Ersen, B. Cramer, H.-U. Humpf, *Mycotoxin Research*, 2016, **32**, 7-18.
10. M. F. Abdallah, G. Girgin, T. Baydar, R. Krska, M. Sulyok, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, **97**, 4419-4428.
11. Z. Veprikova, M. Zachariasova, Z. Dzuman, A. Zachariasova, M. Fenclova, P. Slavikova, M. Vaclavikova, K. Mastovska, D. Hengst, J. Hajslova, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, **63**, 6633-6643.
12. S. da Motta, L. M. Valente Soares, *Food Chemistry*, 2000, **71**, 111-116.
13. D. Siegel, S. Merkel, M. Koch, I. Nehls, *Food Chemistry*, 2010, **120**, 902-906.
14. Á. Tölgyesi, J. Stroka, V. Tamosiunas, T. Zwickel, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015, **32**, 1512-1522.
15. L. Lohrey, S. Marschik, B. Cramer, H.-U. Humpf, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**, 114-120.
16. S. Hickert, I. Krug, B. Cramer, H.-U. Humpf, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, **63**, 10879-10884.
17. C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, Smithers Rapra, Shrewsbury, U.K., 1st edn., 2013.
18. J. Czulak, A. Jakubiak-Marcinkowska, A. Trochimczuk, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013, **2013**, 9.
19. H. Lian, Y. Hu, G. Li, *Journal of Separation Science*, 2014, **37**, 106-113.
20. L. Armelao, S. Quici, F. Barigelletti, G. Accorsi, G. Bottaro, M. Cavazzini, E. Tondello, *Coordination Chemistry Reviews*, 2010, **254**, 487-505.
21. Y.-M. Luo, J. Li, L.-X. Xiao, R.-R. Tang, X.-C. Tang, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, **72**, 703-708.
22. J. Zdunek, E. Benito-Peña, A. Linares, A. Falcimaigne-Cordin, G. Orellana, K. Haupt, M. C. Moreno-Bondi, *Chemistry – A European Journal*, 2013, **19**, 10209-10216.
23. H. Kim, Y. Kim, J. Y. Chang, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2012, **50**, 4990-4994.
24. M. F. Carroll, A. R. Bader, *Journal of the American Chemical Society*, 1952, **74**, 6305-6305.

25. X.-F. Wang, T.-F. Si, Q.-B. Li, Z.-Y. Zhu, X.-J. Zhu, S. Qiang, C.-L. Yang, *Archive for Organic Chemistry*, 2010, **2011**, 31-48.
26. S. Asam, Y. Liu, K. Konitzer, M. Rychlik, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**, 2980-2987.
27. S. Inoue, T. Kumagai, H. Tamezawa, H. Aota, A. Matsumoto, K. Yokoyama, Y. Matoba, M. Shibano, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2011, **49**, 156-163.
28. M. Sato, H. Ogasawara, K. Kato, M. Sakai, T. Kato, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1983, **31**, 4300-4305.
29. R. J. Clemens, J. A. Hyatt, *The Journal of Organic Chemistry*, 1985, **50**, 2431-2435.
30. J. Poncet, P. Jouin, B. Castro, L. Nicolas, M. Boutar, A. Gaudemer, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1990, 611-616.
31. M. M. Titirici, A. J. Hall, B. Sellergren, *Chemistry of Materials*, 2002, **14**, 21-23.
32. P. Nockemann, E. Beurer, K. Driesen, R. Van Deun, K. Van Hecke, L. Van Meervelt, K. Binnemans, *Chemical Communications*, 2005, 4354-4356.
33. N. B. D. Lima, A. I. S. Silva, P. C. Gerson, Jr., S. M. C. Gonçalves, A. M. Simas, *PLOS ONE*, 2016, **10**, e0143998.
34. A. Rico-Yuste, J. Walravens, J. L. Urraca, R. A. G. Abou-Hany, A. B. Descalzo, G. Orellana, M. Rychlik, S. De Saeger, M. C. Moreno-Bondi, *Food Chemistry*, 2018, **243**, 357-364.

DISCUSIÓN

INTEGRADORA

8.1. Hidrogeles de impronta molecular como materiales funcionales en envases activos

Existe un gran interés en el desarrollo de envases activos para la liberación controlada de compuestos que permitan extender la vida útil de los alimentos y mejorar su calidad. En este capítulo se tratarán aspectos relacionados con la síntesis y aplicación de hidrogeles de impronta molecular para la liberación controlada de antioxidantes. Concretamente, se ha trabajado en la selección de la molécula plantilla y de los monómeros funcionales, la evaluación del efecto de la presencia de porógeno en la mezcla de prepolimerización sobre el polímero obtenido, el efecto del espesor de las membranas poliméricas sobre la liberación controlada y la capacidad antioxidante del material en diversos simulantes alimentarios.

8.1.1. Síntesis de la molécula plantilla

En la síntesis de los MIPs, habitualmente se emplea el analito como molécula plantilla para la generación de cavidades selectivas. No obstante, en algunos casos se pueden utilizar compuestos, también conocidos como subrogados o mímicos moleculares, con una estructura lo más parecida posible a la del analito, para la síntesis del material. Las razones por las cuales se recurre a esta aproximación incluyen evitar el efecto sangrado durante la aplicación del polímero, la toxicidad del analito, su baja disponibilidad y/o su elevado coste.^{410,411} Por otra parte, la molécula plantilla puede interferir en el proceso de polimerización, o pasar a formar parte de la red polimérica si incluye en su estructura grupos funcionales polimerizables como ocurre en el caso del FA. En la bibliografía se ha descrito que esta molécula puede entrecruzarse con polisacáridos, empleándose para incrementar la viscosidad, o formar geles como la pectina o los arabinosilanos, así como reaccionar con aminoácidos de las proteínas produciendo el entrecruzamiento entre cadenas.²⁸¹ Estos inconvenientes motivaron la búsqueda de un análogo estructural del FA para su empleo como plantilla durante la reacción de polimerización.

De esta forma se procedió a la hidrogenación catalítica del FA, tal y como se describe en el apartado 7.1.2.2. Mediante esta reacción, se obtuvo el ácido 3-(4-hidroxi-

3-metoxifenil)propanoico o ácido hidroferúlico (HFA) que presenta una estructura muy similar a la del compuesto de partida, salvo por la ausencia del doble enlace. Esta molécula se caracterizó mediante ^1H -RMN (descrito en el apartado 7.1.5.2) y FTIR. En el análisis mediante resonancia, se observaron los desplazamientos más relevantes, correspondientes a las señales de los protones relativos al enlace hidrogenado, los cuales aparecen a 2.90 y 2.65 ppm ($-\text{CH}_2-$), en lugar de a 7.71 y 6.29 ppm ($=\text{CH}-$), e integrando a dos protones en lugar de uno tras la hidrogenación. Por otro lado, en el espectro de FTIR se observó la desaparición de la banda a 1600 cm^{-1} , correspondiente a la vibración ($=\text{C}-\text{H}$), confirmando la correcta hidrogenación de la molécula.

Una vez caracterizado estructuralmente, el HFA se empleó para la síntesis de los hidrogeles.

8.1.2. Selección de los monómeros funcionales

La rigidez de una red polimérica depende de su grado de entrecruzamiento y afecta a la selectividad de los sitios de unión para el reconocimiento de la especie de interés. Los hidrogeles son materiales poco entrecruzados y el reconocimiento se puede ver comprometido por el hinchamiento de la red polimérica en medios acuosos. Es por ello que la afinidad de los analitos por el polímero, en términos de grupos funcionales complementarios, debe ser máxima para compensar la baja estabilidad física de las cavidades, en comparación con los MIPs convencionales.⁴¹²

Existen diversas técnicas que permiten evaluar las interacciones entre los monómeros funcionales y la molécula plantilla, tanto antes como después de la polimerización. Gracias a la posibilidad de formar el complejo en disolución, y asumiendo que el comportamiento de éste sea el mismo durante la polimerización, puede determinarse la estequiometría y estabilidad del complejo empleando espectroscopia UV-VIS o ^1H -RMN, siendo esta última muy utilizada para la determinación de las constantes de afinidad.³⁰⁸ La formación del complejo induce cambios en el desplazamiento químico de los protones característicos de la molécula plantilla y del monómero funcional, que permiten caracterizar el tipo de interacción producida entre ellos.

En este trabajo se evaluó el desplazamiento de los protones del HFA en presencia de dos monómeros funcionales y del monómero diluyente utilizado para la síntesis de los hidrogeles, el metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). Los monómeros funcionales se seleccionaron teniendo en cuenta el tipo de interacción buscada, de tipo electrostático o de enlace de hidrógeno, entre el monómero funcional y el grupo ácido carboxílico del HFA (Figura 33). Los monómeros elegidos fueron la 1-alilpiperazina (1-ALPP) y el metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo (DMAEMA) (Figura 5, apartado 7.1.5.1.).

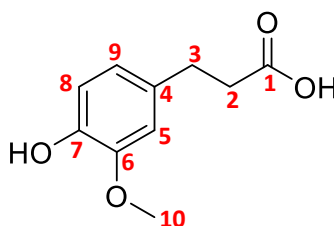


Figura 33. Estructura del ácido hidroferúlico (HFA).

En la Figura 7 del apartado 7.1.5.3. se muestran los espectros de ^1H -RMN de la molécula plantilla en CD_3CN , tanto en ausencia como en presencia de los monómeros utilizados, a partir de los cuales se calcularon los desplazamientos químicos de los protones del HFA en función de la concentración de monómero adicionado, tal y como se describe a continuación.

No se observó ningún desplazamiento en el caso de las señales correspondientes a los protones del monómero diluyente, HEMA, lo que indicaba que no existía ningún tipo de interacción con la molécula plantilla. Según esto, las interacciones no específicas con la molécula plantilla asociadas a la presencia de este componente en la mezcla de prepolimerización deberían ser mínimas.

La adición de DMAEMA, o de 1-ALPP, sí produjeron modificaciones en los desplazamientos químicos de los protones de la molécula plantilla hacia campos más altos. Tanto los protones aromáticos (carbonos 4-9) como los pertenecientes al carbono 10 se desplazaron ligeramente, entre 0.02 y 0.06 ppm. Los protones del carbono 2, directamente conectado con el grupo ácido, resultaron ser los más afectados por la presencia de los monómeros funcionales, con un desplazamiento de alrededor de 0.2 ppm. Este hecho confirmó, por un lado, la interacción entre los grupos funcionales del DMAEMA y la 1-ALPP con el HFA y, por otro, que la interacción tenía lugar por dicho

grupo, ya que los protones cercanos eran los más afectados en términos de apantallamiento. De esta manera se demostró la posibilidad de utilizar ambos monómeros funcionales para la síntesis del MIP. No se llevó a cabo la determinación de las constantes de afinidad monómero-plantilla mediante ^1H -RMN dado que el estudio solo pretendía confirmar la interacción entre los monómeros seleccionados y la plantilla.

8.1.3. Síntesis de los hidrogeles de impronta molecular

Una vez evaluada la interacción de los monómeros funcionales con la molécula plantilla se procedió a la síntesis de los hidrogeles, con las composiciones y en las condiciones descritas en la Tabla 2 (apartado 7.1.5.1.). Tras su síntesis, se evaluó la capacidad de carga de los mismos en función de su composición y de la naturaleza del disolvente de incubación (apartado 7.1.3.3). En la Figura 3 (apartado 7.1.3.3) se comprueba que, de acuerdo a los estudios de ^1H -RMN, el polímero sintetizado exclusivamente con HEMA (A) no reconoce al FA en el disolvente óptimo de carga (agua). Estos datos proporcionaron información acerca de las interacciones no específicas de la red polimérica, debidas a la interacción no específica con el material y al atrapamiento físico del analito como consecuencia del hinchamiento de la matriz.

En la síntesis de los hidrogeles se tuvieron en cuenta otros factores que podrían afectar al reconocimiento y posterior liberación del FA en los alimentos tales como el empleo de un porógeno como el ACN en la mezcla de prepolimerización y el espesor de las membranas poliméricas (0.5 y 0.9 mm).

8.1.3.1. Estudio de la presencia de porógeno en la mezcla de prepolimerización

La naturaleza y concentración de porógeno son parámetros críticos en la síntesis de los MIPs, ya que ambos pueden tener un efecto importante sobre la estructura de la red polimérica.⁴¹³ Sin embargo, cuando se sintetizan hidrogeles es posible prescindir del uso de disolventes, siempre y cuando todos los componentes de la mezcla de prepolimerización sean líquidos y/o solubles entre sí, dando lugar a una disolución homogénea. Este hecho suele ser habitual cuando se sintetizan hidrogeles basados en HEMA como componente mayoritario, ya que al ser líquido permite disolver al resto de los componentes de la mezcla.^{414,415} No obstante, en la síntesis de hidrogeles es habitual recurrir al uso de disolventes para fabricar materiales a gran escala, ya que favorecen la

disipación del calor. Sin embargo, la ausencia de disolvente permite polimerizaciones más rápidas y no es necesario eliminarlo tras la síntesis, aunque puede suponer una limitación a la hora de controlar la polimerización radicalaria.⁴¹⁶

En el presente trabajo no se apreciaron problemas de solubilidad que obligaran al uso de disolventes durante la síntesis de los MIHs. No obstante, se evaluó la influencia de un porógeno, el ACN, sobre las propiedades de los hidrogeles obtenidos. Para ello se sintetizaron tres polímeros (A, C y G) en ausencia de porógeno (Tabla 2, apartado 7.1.5.1.) y otros sustituyendo 500 μ L de HEMA por el mismo volumen de ACN, dando lugar a los polímeros D, F y H, respectivamente.

Los materiales en los que el componente principal era HEMA mostraron espectros de FTIR equivalentes, por lo que no se obtuvo ninguna información concluyente sobre el efecto de la presencia de ACN en la estructura y composición de los hidrogeles sintetizados.

A continuación, se evaluó el grado de hinchamiento de los diferentes polímeros, tal y como se describe en el apartado 7.1.2.4. En la Figura 34 se muestran los perfiles de hinchamiento de los MIHs y NIHs. En el apartado 7.1.3.2. se describen detalladamente las diferencias en los perfiles de hinchamiento obtenidas para los distintos polímeros, en función de los monómeros funcionales utilizados para su síntesis, así como las derivadas de la impronta. En este apartado solo se van a destacar las diferencias encontradas por el empleo de un porógeno durante la síntesis del hidrogel.

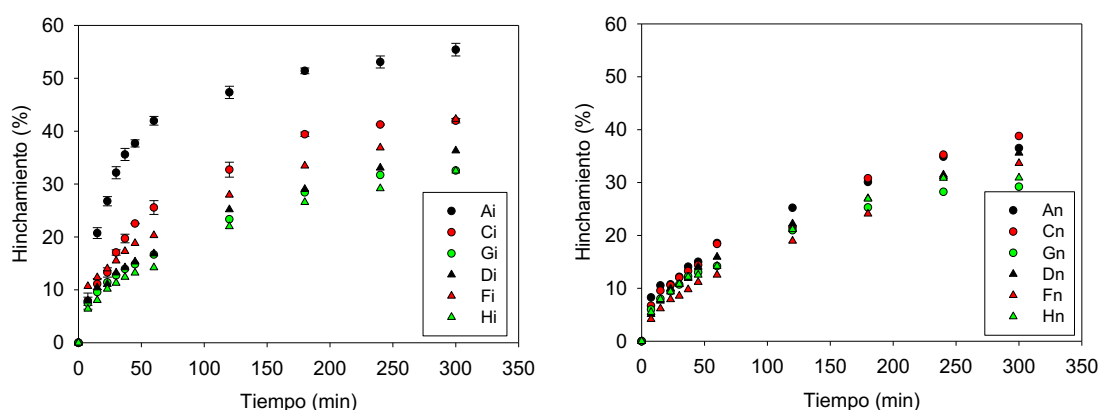


Figura 34. Perfiles de hinchamiento de los MIHs (izquierda) y NIHs (derecha) sintetizados con HEMA (A), DMAEMA/HEMA (C) y 1-ALPP /HEMA (G) como monómeros funcionales sin porógeno y los respectivos polímeros sintetizados utilizando ACN (D, F y G, respectivamente) (n = 3).

En este tipo de materiales el disolvente no tiene un efecto apreciable sobre la estructura de la red, especialmente cuando se emplea en pequeñas cantidades. Teniendo en cuenta este hecho, las diferencias encontradas en los perfiles de hinchamiento podrían atribuirse a la disminución de la cantidad de HEMA en la composición del material, factor que tiene un efecto importante en el comportamiento del hidrogel.

En todos los casos el hinchamiento de los hidrogeles sintetizados en presencia de ACN era inferior, en mayor o menor medida, al de los sintetizados sin porógeno. Este hecho resultaba menos evidente en los polímeros preparados con 1-ALPP como monómero funcional, en consonancia con los resultados de la comparación entre MIH y NIH (Figura 2, apartado 7.1.3.2.). Estas escasas diferencias podrían ser debidas a la variación estructural generada por las diferentes velocidades de propagación de los monómeros utilizados, evidente cuando se mezclan monómeros de diferente naturaleza.³²¹ Este efecto puede generar redes menos porosas, de manera que la presencia de la molécula plantilla, o del porógeno, no afectaría al hinchamiento de manera crítica. De igual manera se comprobó que la ausencia de la molécula plantilla durante la síntesis de los NIHs afectaba a la estructura de la red polimérica disminuyendo la porosidad, como ya se mencionó anteriormente.³¹⁰ Por ello los efectos derivados de la presencia de porógeno y disminución de la cantidad de HEMA fuesen menos apreciables en los NIHs sintetizados, de manera que las conclusiones más destacables se pudieron extraer del comportamiento de los MIHs.

En referencia a los polímeros de impronta molecular es necesario diferenciar los MIHs sintetizados con HEMA (A y D) de los sintetizados con HEMA/DMAEMA (C y F) y con HEMA/1-ALPP (G y H) como monómeros funcionales. En el caso de los hidrogeles de P(HEMA-*co*-EDMA) las diferencias en el perfil de hinchamiento fueron apreciables, siendo alrededor de un 20% mayores en el caso de los polímeros sintetizados en ausencia de ACN. En el caso de los hidrogeles de P(HEMA-*co*-DMAEMA-*co*-EDMA) también se encontraron diferencias, aunque menores que en el caso anterior, posiblemente debido al distinto ordenamiento de la red polimérica generado por las interacciones monómero funcional-molécula plantilla. En ambos casos se evidenció cómo la presencia de ACN y por tanto, la menor cantidad de HEMA, afectaba al hinchamiento de los hidrogeles basados en P(HEMA). Este hecho se hizo más evidente para los hidrogeles A y D. En

ambos casos no existía ninguna interacción entre monómeros funcionales y molécula plantilla, por lo que no se generan cavidades de unión específicas. Este factor puede favorecer un ordenamiento diferente durante la formación de la red polimérica de forma que una ligera disminución de la cantidad de HEMA puede tener un efecto crítico en la estructura del hidrogel.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la composición del hidrogel en la capacidad de carga de los polímeros. Para ello se incubaron tanto los MIHs como los NIHs (90 mg) con 5 mL de una disolución 0.068 mM de FA en agua durante 48 h, como se describe en el apartado 7.1.3.3.

En la Figura 35 se muestra el reconocimiento de los diferentes hidrogeles. Se observa que existen diferencias significativas entre el MIH y el NIH para todas las composiciones, a excepción de A y B. Si bien el estudio anterior mostraba diferencias en el grado de hinchamiento que, en un principio, podrían traducirse en un diferente reconocimiento, en este experimento se demuestra la importancia de la impronta sobre la retención selectiva.

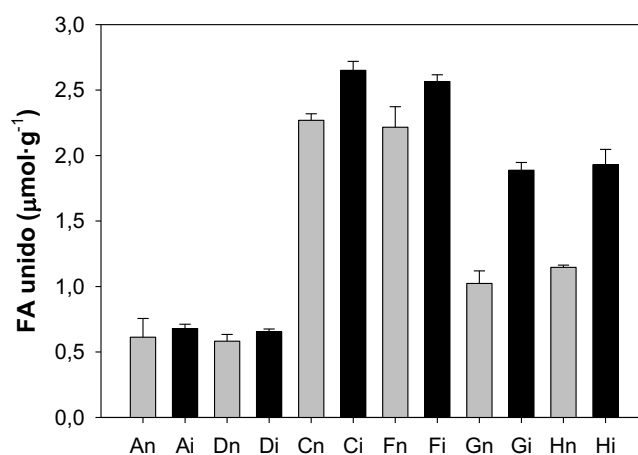


Figura 35. Estudio de reconocimiento de los MIHs (negro, i) y NIHs (gris, n) tras su incubación durante 48 h en una disolución de FA en agua, 0.068 mM ($n = 3$, RSD < 12%). Los códigos de los hidrogeles se muestran en la Tabla 2 (apartado 7.1.5.1.) y en el apartado 8.1.3.1.

8.1.3.2. Estudio de la influencia del grosor de los hidrogeles

En el caso de los hidrogeles, el espesor de los mismos puede tener gran importancia sobre el reconocimiento de la molécula plantilla, ya que va a afectar a la difusión del analito en el material.

Para evaluar la influencia de dicho parámetro se sintetizaron polímeros P(DMAEMA-*co*-HEMA-*co*-EDMA), tanto con como sin impronta, con la composición T (Tabla 2, apartado 7.1.5.1.) utilizando espaciadores de silicona de 0.5 y 0.9 mm de espesor. Los polímeros sintetizados (20 mg) se incubaron durante 18 h en una disolución 4 mM de FA en agua y se evaluó la cantidad de analito retenido mediante HPLC-DAD. Es necesario resaltar que en ninguno de los casos se alcanzó la saturación debido a limitaciones de solubilidad del analito en agua.

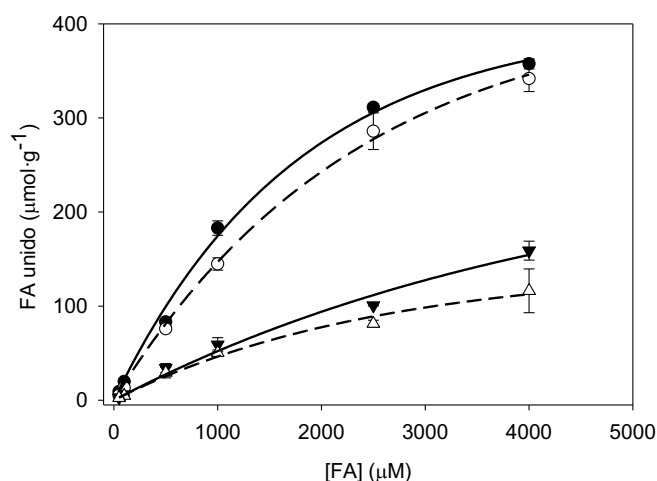


Figura 36. Curvas de capacidad de carga de MIHs P(DMAEMA-*co*-HEMA-*co*-EDMA) (T) con un grosor de 0.5 mm (círculos) y 0.9 mm (triángulos) incubadas en una disolución 4 mM de FA en agua. Los MIHs están indicados en negro y los NIHs en blanco (n = 3).

Como se puede apreciar en las curvas mostradas en la Figura 36, la diferencia en la capacidad de carga de los hidrogeles sintetizados con diferentes grosores es importante. En el caso de los polímeros con un grosor de 0.5 mm, la capacidad de carga era aproximadamente 3 veces superior a los de 0.9 mm de espesor, que mostraban una ligera tendencia hacia la saturación. Este hecho evidenciaba la importancia del espesor del material sobre su capacidad de carga, como se ha descrito para los hidrogeles basados en P(HEMA).⁴¹⁵

Por otra parte, los hidrogeles de menor grosor requerían tiempos de incubación más cortos para alcanzar la saturación, lo que, a igualdad de tiempos de incubación, se traducía en una mayor capacidad de carga de los polímeros de 0.5 mm frente a los de 0.9 mm. En conclusión, el espesor de las membranas y, por tanto, la accesibilidad del analito al interior de la red polimérica afecta tanto a la capacidad de carga como a la difusión

del analito en el material, demostrando mejor efectividad los hidrogeles de 0.5 mm. No obstante, y a pesar de estos resultados, los estudios de estabilidad de las membranas demostraron que los hidrogeles de menor espesor se fragmentaban fácilmente durante su manipulación, siendo poco adecuados para su empleo como materiales para envases activos, por lo que se seleccionaron los de 0.9 mm de espesor para estudios posteriores.

8.1.4. Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrogeles en simulantes alimentarios.

Conceptualmente, los hidrogeles sintetizados podrían aplicarse para la liberación controlada de antioxidantes en alimentos y extender la vida útil de los mismos. Es por ello que se decidió evaluar la capacidad antioxidante de estos materiales cargados con FA en diferentes simulantes alimentarios (Tabla 13), definidos en la Directiva Europea (UE) n° 10/2011,²³⁹ a fin de demostrar su comportamiento y efectividad.

Tabla 13. Lista de simulantes alimentarios y asignación general de los mismo a los alimentos de acuerdo con la Directiva Europea en base al reglamento (UE) n° 10/2011.²³⁹

Abreviatura	Simulante	Alimento
A	Etanol 10% (v/v)	Alimentos acuosos
B	Ác. Acético 3% (p/v)	Alimentos ácidos – pH < 4.5
C	Etanol 20% (v/v)	Alimentos alcohólicos (≤ 20%) y alimentos con un cierto carácter lipofílico
D1	Etanol 50% (v/v)	Alimentos alcohólicos (> 20%) y emulsiones de grasa en agua – productos lácteos
D2	Aceite vegetal	Alimentos con grasas libres en la superficie
D2*	Etanol 95% (v/v)	Alcohol etílico sin desnaturalizar utilizado en procesos fermentativos

Para la evaluación de la actividad antioxidante del FA liberado por los hidrogeles se empleó el método descrito por Brand-Williams y col.⁴¹⁷, con ligeras modificaciones, que se basa en la monitorización del radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

(DPPH*). El compuesto presenta un máximo de absorción a 515 nm, que desaparece al reducirse en presencia de antioxidantes. Para la realización de este ensayo se utilizó un HPLC-DAD con el inyector programado en modo automático. De esta manera se podían controlar los tiempos de incubación y utilizar menores volúmenes de reactivos, así como mejorar el análisis de los sobrenadantes. El análisis se llevó a cabo utilizando una columna LUNA™ C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) de Phenomenex (Torrance, CA, USA). Se programó la bomba en modo isocrático con MeOH como fase móvil, a un caudal de 1 mL·min⁻¹. El inyector se programó para tomar 25 μL de la disolución de FA y depositarlos en un vial que contenía 1 mL de DPPH (120 mg·L⁻¹). Tras 30 min de incubación. Se llevó a cabo el análisis del sobrenadante inyectando 50 μL del vial directamente en la columna cromatográfica.

El porcentaje de inhibición se calcula empleando la Ecuación 1:

$$I (\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \cdot 100 \quad (1)$$

dónde A_0 y A_s representan las áreas de la referencia y de la muestra, respectivamente, a 517 nm. Previamente, se realizó un calibrado para establecer la relación entre el porcentaje de inhibición y la concentración de FA que se muestra en la Figura 37. La relación es lineal hasta una concentración de FA de 5 mM, superior a la utilizada para cargar el polímero, por lo que no había problemas para aplicar este método para determinar la actividad antioxidante del FA liberado por los hidrogeles.

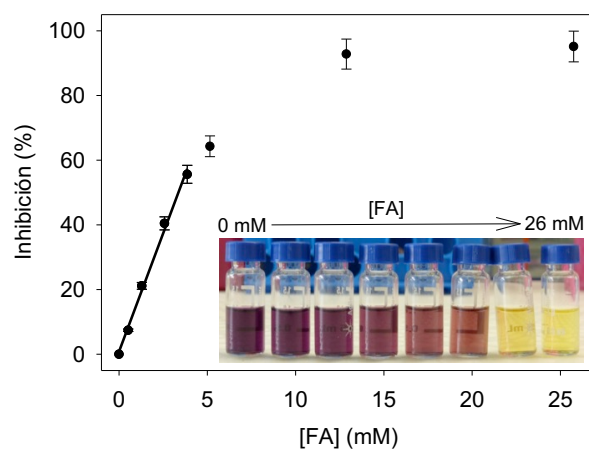


Figura 37. Curva de calibrado del porcentaje de inhibición frente a la concentración de FA en disolución, medida a 517 nm. En la imagen se muestra la variación de color producida, de violeta a amarillo, al aumentar la concentración de FA en la disolución. El tramo inicial se ha ajustado a una línea recta empleando el método de los mínimos cuadrados.

Las pruebas de inhibición se realizaron disponiendo los hidrogeles (T), tanto MIHs como NIHs, previamente incubados con FA (4 mM), en los diferentes simulantes (Tabla 4). Se tomaron alícuotas a lo largo de 5 días y se evaluó la actividad antioxidante del FA liberado en estos medios empleando el método del DPPH*. También se realizó el ensayo utilizando hidrogeles no cargados, a fin de evaluar la inhibición debida exclusivamente al material polimérico. No fue posible realizar el ensayo en el simulante D2 debido a la complejidad de las medidas en una matriz grasa. Es por ello que la capacidad antioxidante de los hidrogeles en latas de mantequilla se evaluó empleando el método del ácido 2-tiobarbitúrico⁴¹⁸ como se describe en el apartado 7.1.3.6. En la Figura 38 se muestran las curvas de inhibición en los diferentes simulantes.

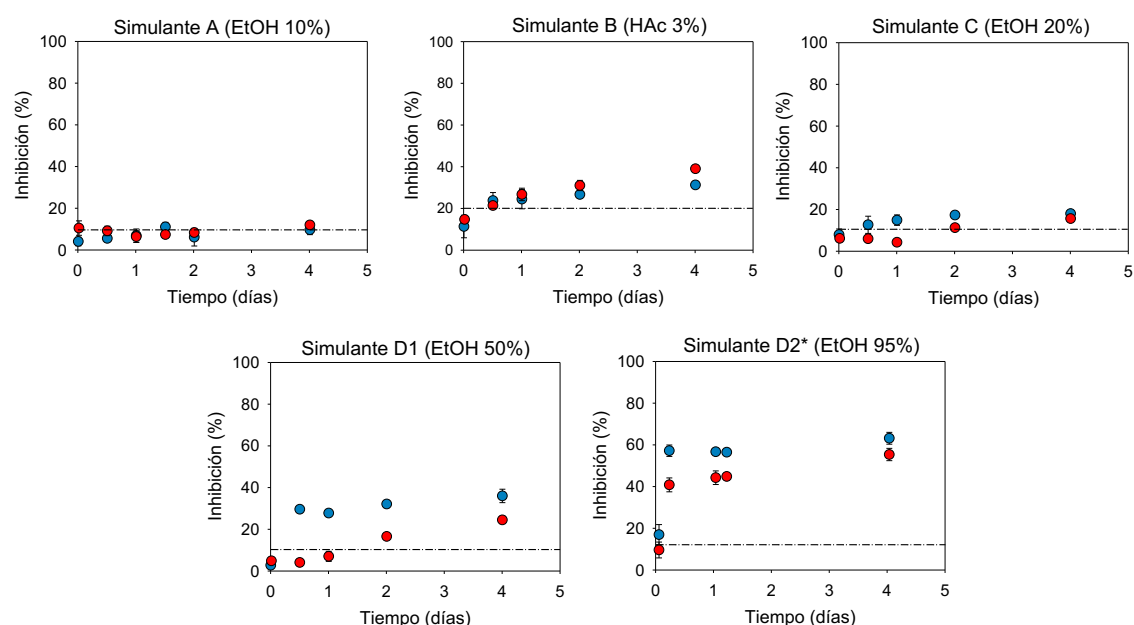


Figura 38. Perfiles de inhibición en los hidrogeles de composición T, MIHs (azul) y NIHs (rojo), en los diferentes simulantes alimentarios (Tabla 13, n=3). La línea de puntos indica la inhibición debida al material polimérico.

En las gráficas se observa que la liberación del FA por parte de los geles P(DMAEMA-co-HEMA-co-EDMA) se produce de manera controlada a lo largo de los días, demostrando el importante papel de la impronta en la liberación controlada del antioxidante. Es importante recordar que el FA interacciona con el polímero a través de enlaces de hidrógeno, lo que facilita su liberación progresiva sin la actuación de agentes externos.

Comparando la liberación de MIHs y NIHs se observa que, en todos los casos exceptuando el medio ácido, la liberación de FA de los materiales con impronta es mayor y más rápida que para los polímeros sin impronta. Esto puede deberse, a que la presencia de los sitios de unión selectivos incrementa la capacidad de carga de FA, lo que se traduciría en una mayor liberación del analito al medio. En el caso de los NIHs la retención del antioxidante se debe a interacciones no específicas analito-polímero y, a la vista de los resultados obtenidos, éstas dan lugar a una liberación más lenta y a una efectividad mucho menor en la inhibición de la oxidación.

En cuanto a la liberación en los diferentes simulantes, ésta depende principalmente de la naturaleza del mismo. La presencia de EtOH afecta tanto a la solubilidad del FA en el medio, aumentando con el contenido de disolvente orgánico en mezclas hidro-alcohólicas como, al hinchamiento del hidrogel. Un incremento de la concentración de etanol en el simulante debería, por tanto, favorecer la liberación del FA al medio. Por un lado, la solubilidad del FA en EtOH es mayor que en agua, lo que en principio debía facilitar su salida a medida que aumenta el contenido de alcohol en el simulante. No obstante, se ha descrito que la presencia de EtOH puede favorecer la deshidratación de los hidrogeles basados en HEMA,⁴¹⁹ lo que afectaría negativamente a la difusión del FA desde los sitios de unión al disolvente. En la Figura 38 se observa que este factor no afecta a la liberación del antioxidante ya que, al aumentar el contenido alcohólico en el simulante, aumenta tanto la cantidad de FA liberado como la velocidad de liberación.

En el caso del simulante B, el empleo de un medio acuoso ácido (HAc, 3%; *p/v*) afecta tanto a la solubilidad del FA como al hinchamiento del gel. Según la bibliografía los hidrogeles basados en P(HEMA) presentan un hinchamiento superior en medio básico que en medio ácido,⁴²⁰ lo que iría en detrimento de la liberación del FA. Como se puede apreciar en el perfil de inhibición (Figura 38) en este caso se observa un comportamiento contrario al del resto de los simulantes. Ambos hidrogeles (MIH y NIH) liberaron la misma cantidad de FA y a la misma velocidad. Esto podría deberse al menor grado de hinchamiento del gel en este medio, que limita la liberación de las moléculas de FA atrapadas en cavidades selectivas en el interior de la red polimérica.

No obstante, se comprobó que en todos los simulantes, a excepción de A donde la inhibición fue debida exclusivamente a la presencia del material polimérico, se producía una inhibición rápida y prolongada de la oxidación durante todo el tiempo del ensayo, gracias a la liberación del FA por parte de los hidrogeles. Además, se comprobó que el empleo de los MIHs mejoraba los resultados, aumentando la cantidad liberada y disminuyendo los tiempos de actuación, en aquellos simulantes con un contenido de EtOH superior al 20 %, correspondientes a alimentos grasos o con un cierto contenido lipofílico que les hacen más susceptibles a la autooxidación. De esta forma se demostró que los MIPs podían emplearse para la fabricación de envases activos de liberación controlada y alargar la vida útil de los alimentos evitando su oxidación.

8.1.5. Aplicación de los hidrogeles como sistemas de liberación controlada en muestras de mantequilla

Una vez optimizadas tanto la composición de los MIHs como las condiciones de carga con FA (apartado 7.1) se procedió a la aplicación de los mismos en muestras de mantequilla. Se seleccionó el polímero preparado con DMAEMA, como monómero funcional, con una estequiometría 1:8 (plantilla:monómero funcional), ya que fue el que presentó mayor capacidad de carga del antioxidante en agua, alrededor de $11 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 4, apartado 7.1.3.3.). Si bien el factor de impronta respecto a los geles basados en 1-ALPP era menor ($\text{IF}_{1\text{-ALPP}} > 1.85$; $\text{IF}_{\text{DMAEMA}} > 1.61$), en este caso se dio preferencia a la capacidad de carga dado que este factor tiene mayor interés para la preparación del envase activo. Estos resultados se confirmaron midiendo las isotermas de adsorción (apartado 7.1.3.4.) de los distintos hidrogeles, en las que se comprueba que la diferencia entre el MIH y el NIH es menor para aquellos basados en DMAEMA. No obstante, estos polímeros presentan un mayor número de sitios de unión y constantes de asociación más elevadas, por lo que se seleccionaron para su aplicación en alimentos.

Por otra parte, de acuerdo a la legislación vigente (UE) N° 10/2011 *sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos*,²³⁹ los monómeros de tipo metacrilato como el DMAEMA pueden emplearse para el envasado de alimentos. Sin embargo, el empleo del 1-ALPP no está recogido en la legislación por lo que sería necesario hacer un estudio previo de su compatibilidad para esta aplicación. En

cualquier caso, la inocuidad de este tipo de materiales se demostró en un trabajo paralelo, no incluido en esta Tesis Doctoral, realizando estudios de migración que demostraron que no se liberaban componentes potencialmente dañinos del material al alimento durante la utilización del envase.²⁵²

El hidrogel de P(DMAEMA-*co*-HEMA-*co*-EDMA) se aplicó para evaluar la eficacia antioxidante de los MIPs cargados con FA en mantequilla enlatada (apartado 7.1.3.6.). Como se ha indicado anteriormente, se empleó el método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARs) y se comparó la efectividad de los MIHs y NIHs cargados con FA en tres experimentos diferentes variando, el tiempo de muestreo: cada 2-3 días, cada semana y cada tres semanas. Las muestras se conservaron a 4 °C durante el estudio. Los resultados más relevantes se obtuvieron en el primer estudio de muestreo, que además es el más próximo a una situación real. En la Figura 39 se muestra la evolución de la oxidación lipídica en este experimento confirmándose una inhibición de la oxidación del 40 – 60 % para los MIHs y del 20 – 25% para los NIHs respecto a las muestras control en ausencia de polímero. De esta manera se demostró la gran eficacia de los MIHs en la prevención de la oxidación lipídica sin afectar a las propiedades organolépticas del alimento, manifestando la aplicabilidad de este tipo de materiales para la fabricación de envases activos antioxidantes en la industria alimentaria.

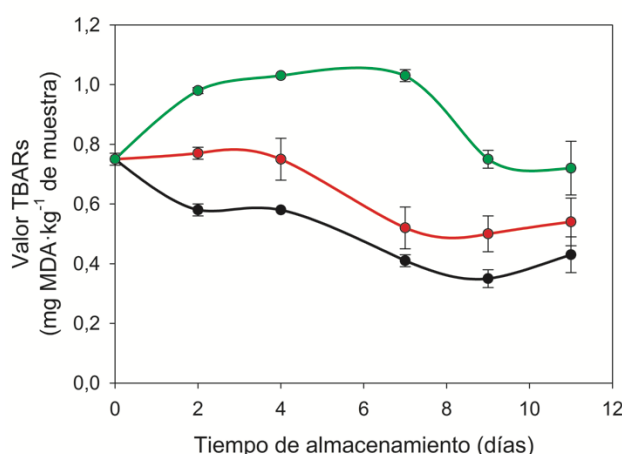


Figura 39. Evolución de la oxidación lipídica, representada como valor TBARS, en muestras de mantequilla cubiertas por el MIH (negro), NIH (rojo) y sin cubrir (verde) tomando muestras cada dos días (n = 3).

8.2. Análisis de furfural empleando membranas poliméricas desechables y medidas colorimétricas con un *smartphone* para evaluar la frescura de la cerveza

La determinación de furfural y su empleo como marcador de frescura en algunos alimentos ha suscitado un gran interés debido a la buena correlación existente entre la concentración de este compuesto y el tiempo de almacenamiento de éstos, por ejemplo, la cerveza. Se han descrito diversos métodos analíticos para la determinación de furfural, aunque la tendencia actual persigue simplificarlos para llevar a cabo medidas rápidas y sencillas en la cadena de producción y en el control de la calidad de la cerveza con menores costes. El trabajo realizado en el curso de la presente Tesis Doctoral fue el resultado de una colaboración entre el grupo de investigación GSOLFA (UCM) y de la empresa Mahou-San Miguel, en el marco del proyecto MIPFOOD (Ref. IPT-060000-2010-14). Los resultados obtenidos permitieron patentar, de forma conjunta entre ambas instituciones, un método para la fabricación de membranas sensoras selectivas a furfural y su aplicación a la determinación del grado de frescura de la cerveza.²⁰⁷

8.2.1. Selección de reactivos para la formación de compuestos coloreados en presencia de aldehídos

El furfural es un aldehído volátil producido, al igual que otros compuestos de estructura similar, durante la reacción de Maillard. Dado que el planteamiento inicial de este trabajo fue la síntesis de un MIP colorimétrico para la determinación de furfural, en una primera etapa se buscaron compuestos que originasen productos coloreados tras su reacción con los aldehídos que facilitaran su determinación. Por esta razón se seleccionaron los reactivos empleados en los tests de Brady,⁴²¹ de Bial,⁴²² de Seliwanoff⁴²³ y de Stenhouse.⁴²⁴

Los principales inconvenientes de las reacciones de Brady, Bial y Seliwanoff para esta aplicación era la inclusión de los agentes derivatizantes en la matriz polimérica y el control de las condiciones de reacción. En el caso de la reacción de Stenhouse, la molécula reactiva podía incorporarse en la membrana polimérica utilizando el monómero 4-vinilanilina (VA) durante su fabricación. Por esta razón se planteó la

síntesis de un MIP empleando VA como monómero funcional y HEMA como diluyente, para la fabricación de hidrogeles, aprovechando así las ventajas que presentan este tipo de materiales en medios hidro-orgánicos para la obtención de las membranas sensoras.

8.2.2. Síntesis de polímeros de impronta molecular selectivos a furfural

Para llevar a cabo la síntesis del MIP se plantearon dos aproximaciones diferentes: a) impronta covalente, a partir del producto de reacción entre el monómero funcional y la plantilla antes de la polimerización y b) impronta no covalente, basada en la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo aldehído de la plantilla y el grupo amino del monómero funcional.

Independientemente de la aproximación planteada, se descartó el uso de furfural como molécula plantilla para la síntesis de los MIPs, ya que debido a su reactividad podría integrarse irreversiblemente en la red polimérica, con la consiguiente pérdida de sensibilidad. Se evaluaron, como alternativa, moléculas con estructura y reactividad similares al analito como el tiofeno-2-carboxaldehído y el ácido 2-tiofenocarboxílico (Figura 40).

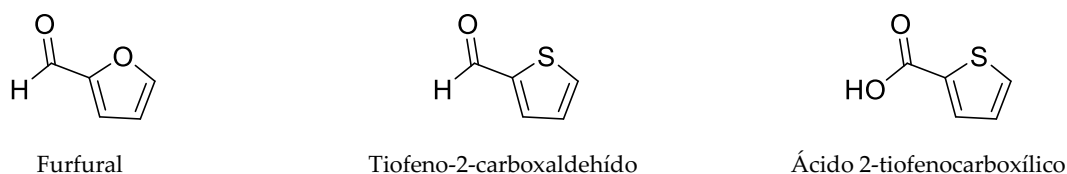


Figura 40. Estructura del furfural, el tiofeno-2-carboxaldehído y el ácido 2-tiofenocarboxílico.

8.2.2.1. Síntesis de MIPs utilizando tiofeno-2-carboxaldehído

En primera instancia se recurrió al uso de tiofeno-2-carboxaldehído como plantilla, ya que su producto de reacción con la anilina presenta un color amarillo anaranjado, evitando la interferencia con el color rojo del producto de reacción con el furfural.

Para la impronta covalente, se llevó a cabo la reacción entre la plantilla y el monómero en medio HCl 1.5 M, con la formación de la imina correspondiente, tal y como se describe en la reacción de Stenhouse.⁴²⁴ Para la impronta no covalente se omitió el empleo del medio ácido manteniendo la composición de la mezcla de polimerización.

La extracción de la molécula plantilla se realizó empleando NaOH 2M para romper la imina, en el caso de la aproximación de impronta covalente, y posteriormente lavando con agua, o agua con HCl 1M para neutralizar el medio. En todos los casos, tras los lavados, se obtuvieron discos de color amarillo oscuro. A continuación, las membranas sensoras se incubaron en una disolución de furfural $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 1 h, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- a) El cambio de color de los MIPs sintetizados empleando impronta covalente en presencia del analito apenas era visible. Esto indicaría que la ruptura del complejo monómero-plantilla no había sido cuantitativa, con la consiguiente reducción en el número de sitios de unión selectivos en la red polimérica.
- b) El cambio de color obtenido para los polímeros de impronta no-covalente también fue menor que el observado en disolución. Además, no se apreciaron diferencias significativas entre el MIP y el NIP, por lo que se concluyó que la impronta tampoco había sido eficaz en este caso.
- c) Comparando la respuesta de los polímeros lavados en agua y en medio ácido, se observó que estos últimos presentaban una intensidad de color superior a los primeros tras la incubación con furfural. Este dato evidencia la importancia del medio ácido en el reconocimiento. De igual manera, se observó que el aumento en la cantidad de VA en la mezcla de polimerización era determinante en la intensidad del color generado, siendo más intenso al aumentar la cantidad de monómero en el polímero.

A pesar de haber observado cierto reconocimiento, las características analíticas del MIP obtenido no eran adecuadas para su aplicación en las muestras de cerveza. Por otra parte, se comprobó que el empleo de una base para la destruir la imina y regenerar el polímero, en la impronta covalente, originaba cambios en la red polimérica. Las membranas sensoras se oscurecían y la plantilla no se extraía cuantitativamente, de forma que los MIPs resultaban inservibles. Por todo ello se decidió abandonar la aproximación de la impronta covalente y llevar a cabo una impronta no covalente utilizando una molécula plantilla alternativa.

8.2.2.2. Síntesis de MIPs utilizando ácido 2-tiofenocarboxílico

Si bien la reacción de Stenhouse entre la anilina y los aldehídos está catalizada por ácidos, la reacción con ácidos carboxílicos requiere condiciones más agresivas de temperatura y disolventes, así como el uso de catalizadores.⁴²⁵ Por esta razón se planteó el uso de una plantilla que incluyese dichos grupos funcionales, pero que no reaccionase covalentemente con la VA, para evitar el empleo de ácidos en la etapa de síntesis y los posteriores lavados en medio básico, que afectaban negativamente a la matriz polimérica. Se seleccionó el ácido 2-tiofenocarboxílico para favorecer la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo amino de la VA y el grupo ácido del derivado de tiofeno. En la Tabla 14, se muestran las composiciones de los polímeros sintetizados.

Tabla 14. Composición de los polímeros sintetizados utilizando ácido 2-tiofenocarboxílico (Ác. 2-tiofeno) como molécula plantilla.

Código	Ác. 2-tiofeno (mmol)	VA (mmol)	HEMA (mmol)	EDMA (mmol)	ABDV (mmol)
VE-17	2.0	2.0	18.5	1.33	40
VE-18	3.0	3.0	18.5	1.33	40
NVE-19	--	2.0	14.4	1.33	40
NVE-20	--	3.0	14.4	1.33	40

Se observó que los MIPs obtenidos empleando esta aproximación presentaban un color amarillento, que no se apreciaba en el caso del NIP dada la ausencia de ácido 2-tiofenocarboxílico. Esto indicaba que se estaba produciendo algún tipo de interacción entre el monómero y la molécula plantilla. La reacción entre la anilina y el ácido 2-tiofenocarboxílico se ha descrito previamente, aunque el medio de reacción incluye reactivos diferentes a los presentes en la mezcla de prepolimerización y el producto de la misma es blanco y no amarillo.⁴²⁶ Por otra parte, cuando se trató de extraer la molécula plantilla mediante lavados de los polímeros con EtOH, se observó que la disolución se teñía de color naranja, solo en el caso del MIP. Esto se atribuyó a la liberación de algún complejo coloreado no polimerizado, formado entre los monómeros y al ácido 2-tiofenocarboxílico u oligómeros no entrecruzados debido a la diferente reactividad, ya que no aparecía en el caso de los NIPs. A continuación, se evaluó el reconocimiento de

furfural en los MIPs incubándolos en presencia de concentraciones crecientes de analito en un medio HCl 29 mM. El mismo estudio se realizó en el caso de los NIPs y los resultados se muestran en la Figura 41.

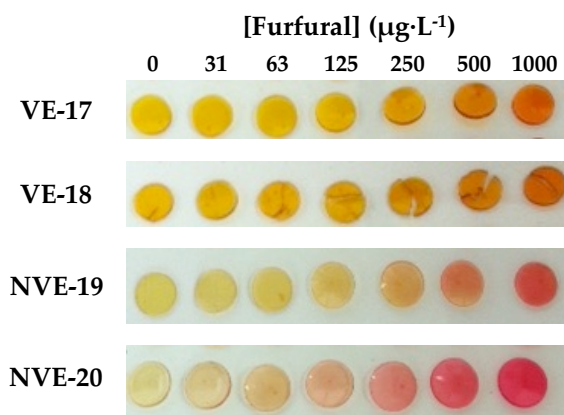


Figura 41. Imágenes de las membranas poliméricas sintetizadas con ácido 2-tiofenocarboxílico como molécula plantilla tras su incubación con disoluciones de furfural ($0 - 1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en EtOH:H₂O (20:80, *v/v*) en presencia de HCl 29 mM durante 1 h. La composición de los MIPs (VE-17 y VE-18) y sus correspondientes NIPs (NVE-19 y NVE-20) se describe en la Tabla 14.

Como se puede observar en la Figura 41, los MIPs sintetizados con ácido 2-tiofenocarboxílico presentaban un color anaranjado oscuro de partida, mientras que los NIPs mostraban un color amarillo claro. Para detectar un cambio de color apreciable en los MIPs, se requerían concentraciones de furfural superiores a $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, observándose el oscurecimiento de las membranas sensoras hasta el color naranja. No se observó el rojo-rosado característico de la reacción de Stenhouse hasta concentraciones de furfural de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Por otro lado, en el caso de los NIPs sí que se apreció un cambio gradual de color en función de la concentración de furfural, condicionado por la cantidad de VA presente en el polímero. Este hecho indicó que no era posible utilizar el ácido 2-tiofenocarboxílico como molécula plantilla, ya que se generaba un compuesto anaranjado que interfería con la aplicación posterior del polímero con fines sensores.

Por otra parte, los resultados obtenidos con el NIP demostraron que no era necesaria la impronta molecular para el desarrollo de un sensor de furfural ya que en presencia de VA y medio ácido se originaba un cambio de color en contacto con el analito que facilitaba su determinación. Por esta razón se decidió trabajar en la síntesis de membranas poliméricas sin impronta, basadas en VA para la fabricación de sensores para la determinación de furfural.

8.2.3. Síntesis de membranas sensoras selectivas a furfural

A la vista de los resultados anteriores se sintetizaron membranas poliméricas variando las relaciones HEMA/VA (Tabla 1, apartado 7.2.2.3.), dado que la concentración de ambos monómeros resultaba crítica en la estabilidad y sensibilidad, respectivamente, de las fases sensoras, tal y como se detalla en el apartado 7.2.3.1. Por un lado, se comprobó que la concentración de VA en la composición polimérica era determinante en la sensibilidad de la respuesta al analito. Así, un aumento de la concentración de dicho monómero en la membrana originaba un incremento de sensibilidad al furfural. No obstante, también afectaba a la estabilidad mecánica de las fases sensoras, que se volvían más frágiles en presencia de elevadas concentraciones de VA (NVE-4 y NVE-5). El empleo de HEMA resultó crítico en lo que respecta a las propiedades estructurales del material, ya que su concentración afecta a la estabilidad mecánica, la hidrofilia y el grado de hinchamiento de las membranas poliméricas. El empleo de bajas concentraciones de HEMA originaba membranas frágiles (NVE-5) mientras que el uso de concentraciones elevadas confería flexibilidad y estabilidad mecánica a los sensores (NVE-1 y NVE-2). Por otra parte, es importante tener en cuenta que la presencia de HEMA afecta también a la difusión del analito hacia los sitios reactivos, dado que favorece el hinchamiento del material e incrementa su hidrofilia. Por todo ello, se seleccionó el polímero NVE-2 para la fabricación de las membranas sensoras, ya que era el material que presentaba mayor sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad mecánica para la determinación de furfural.

Para la medida de la absorbancia de las membranas se utilizó un sistema de fibra óptica acoplado a un mini-espectrofotómetro, midiendo en el intervalo de 470 - 700 nm tras colocar los discos sobre un fondo blanco. Con fines cuantitativos, la señal analítica se fijó en 537 nm y el fondo se monitorizó a 690 nm (apartado 7.2.2.4.).

8.2.3. Estudios de reactividad cruzada

Es posible encontrar diferentes aldehídos en la cerveza que, sin estar relacionados con el envejecimiento de ésta, o presentando variaciones de concentración no lineales con el tiempo, podrían afectar a la respuesta del método desarrollado.⁴²⁷ Para evaluar la selectividad del sensor frente a otros aldehídos volátiles se llevó a cabo un estudio de

interferentes, apartado 7.2.3.2., incubando las membranas poliméricas con disoluciones de otros aldehídos que pueden aparecer en las muestras analizadas como: el 5-hidroximetilfurfural (HMF), acetaldehído, 2-metilpropanal, hexanal, benzaldehído, fenilacetaldehído y trans-2-nonenal (Figura 42).

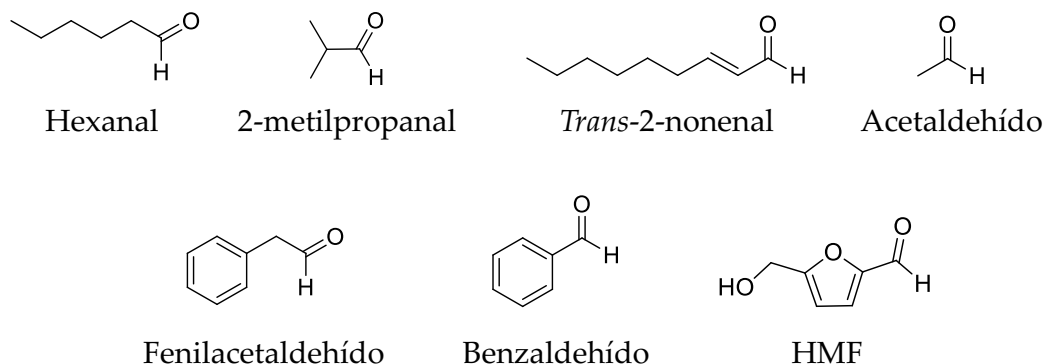


Figura 42. Estructura de los aldehídos volátiles más comunes generados durante el proceso de envejecimiento.

En la figura 4 (apartado 7.2.3.3.) se muestra la variación de señal obtenida en presencia de los aldehídos mencionados anteriormente. Ninguno de los interferentes originó un cambio de color significativo con excepción del HMF. La similitud estructural entre este interferente y el furfural justificaría la aparición de reactividad cruzada, lo que supondría un problema para el análisis de muestras reales, dado que también se trata de un producto de la reacción de Maillard cuya concentración aumenta con el tiempo.¹⁵⁶ No obstante, y como se comenta en el apartado 7.2.3.2., el contenido de HMF en cervezas es muy bajo ($34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), incluso en aquellas con un elevado tiempo de almacenamiento, por lo que su interferencia se puede considerar despreciable en las muestras analizadas, dado que solo se observa un cambio significativo de la señal analítica para concentraciones superiores a $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 43).

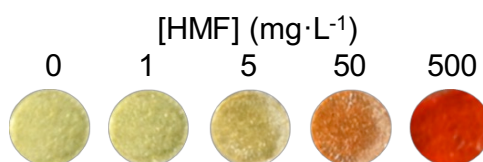


Figura 43. Imágenes de las membranas poliméricas NVE-2 incubadas en presencia de diferentes concentraciones de HMF en EtOH:H₂O (20:80, v/v).

Otra interferencia a tener en cuenta es el acetaldehído, ya que se trata de un compuesto mayoritario en la cerveza.⁴²⁷ Aunque en el estudio anterior se confirmó que

la presencia de este compuesto no alteraba el color de las membrana poliméricas, se decidió evaluar si su presencia afectaba a la respuesta de los sensores al furfural. Para ello, las membranas se incubaron en disoluciones de H₂O:EtOH (94.6:5.4, *v/v*) que contenían diversas concentraciones de furfural (62.5 – 500 µg·L⁻¹) y acetaldehído (0 – 3 mg·L⁻¹) evaluándose la respuesta de las membranas sensoras a $\lambda_{\text{abs}} = 537$ nm.

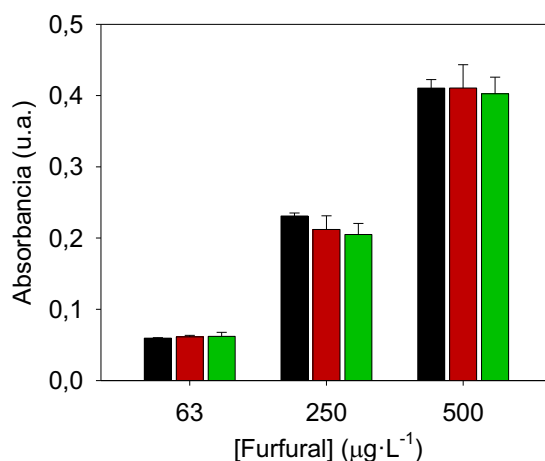


Figura 44. Evaluación de la respuesta de las membranas sensoras a diferentes concentraciones de furfural (63, 250 y 500 µg·L⁻¹) en presencia de 0 (negro), 1.3 (rojo) y 3 mg·L⁻¹ (verde) de acetaldehído en un medio H₂O:EtOH (94.6:5.4, *v/v*). (n = 3; $\lambda_{\text{abs}} = 537$ nm).

Como se muestra en la Figura 44 no hay diferencias significativas entre las respuestas obtenidas para las diferentes concentraciones de furfural en presencia o ausencia de acetaldehído, incluso a elevadas concentraciones de analito que se corresponderían con un periodo de almacenamiento de 6 meses.⁴²⁷ En conclusión el acetaldehído no interacciona con los grupos reactivos de la membrana y, por tanto, su presencia no afecta a la determinación de furfural como marcador de frescura.

8.2.4. Evaluación de la respuesta al furfural en simulantes alimentarios

En un principio el método descrito se desarrolló para evaluar el envejecimiento de la cerveza durante su almacenamiento. Sin embargo, el furfural puede estar presente en una gran variedad de alimentos en los que tiene lugar la reacción de Maillard, ya sea de manera intencionada o no, por ejemplo, la leche y bebidas alcohólicas. En primer lugar, y enfocando el estudio a bebidas alcohólicas, se evaluó la respuesta de las membranas sensoras en agua y en muestras hidroalcohólicas, con hasta un 20% (*v/v*) de contenido en EtOH, demostrándose que no existían diferencias significativas entre los

los calibrados realizados en dichas mezclas, pero sí en ausencia de EtOH (apartado 7.2.3.2.). Por otra parte, se evaluó la respuesta de las membranas sensoras en los diferentes simulantes alimentarios establecidos por la legislación (Tabla 4),²³⁹ de manera que se abarcara el mayor número de alimentos posibles. En la Figura 45 se pueden observar las respuestas de los sensores medidas a 537 nm, así como una imagen de los discos tras la incubación.

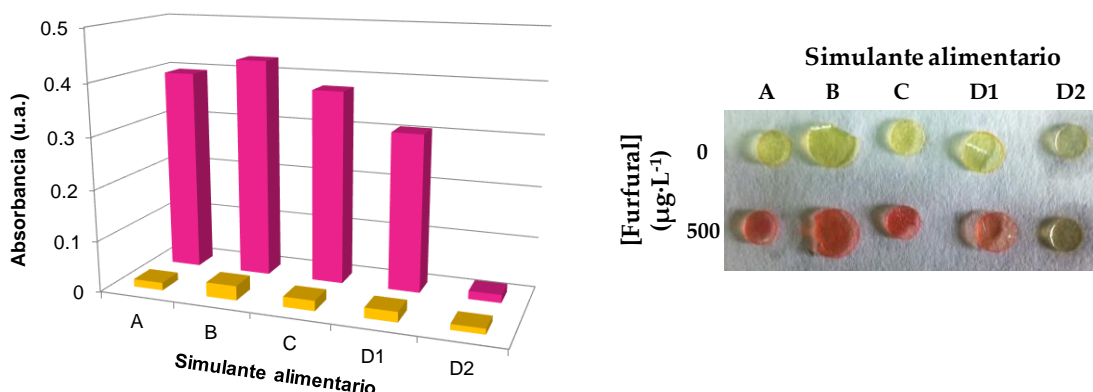


Figura 45. Izquierda, evaluación de la respuesta de las membranas sensoras en los diferentes simulantes alimentarios (Tabla 4) para concentraciones de 0 (amarillo) y 500 (rosa) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural ($\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$). Derecha, imágenes de las membranas poliméricas tras la incubación en las condiciones mencionadas.

Se confirmó que no existían diferencias significativas en las respuestas de los sensores para los simulantes A y C, con un contenido en EtOH del 10 al 20% (*v/v*). En el simulante D1, donde el contenido de EtOH es superior (50%, *v/v*), se observó una disminución de la señal de aproximadamente un 25% con respecto a las otras mezclas hidro-alcohólicas, posiblemente debido a que los hidrogeles basados en P(HEMA) se deshidratan en este medio, afectando a la señal analítica.⁴¹⁹ Como se puede observar en la Figura 45, el color de las membranas en este simulante es mucho más claro que en los discos incubados en los simulantes A y C. Para el simulante B (HAc, 3%; *p/v*) la señal obtenida es muy superior a la de los otros simulantes. Además, los discos se hincharon llegando incluso a fragmentarse. Este comportamiento podría explicarse considerando que el medio ácido cataliza la reacción de formación de la imina coloreada, facilitando un mayor progreso de la reacción y una mayor coloración. Por otro lado, el ácido podría afectar al hinchamiento de los polímeros, puesto que en el caso de los geles basados en P(HEMA) el grado de hinchamiento es superior en medios básicos que en medios ácidos.⁴²⁰ Sin embargo, en este caso se trataba de un ácido orgánico débil a baja

concentración, por lo que el efecto sobre el hinchamiento sería pequeño y estaría gobernado por el medio acuoso, que favorece tanto el hinchamiento de los hidrogeles como la difusión de los analitos hacia los centros reactivos. Finalmente, en el caso del simulante D2, y tal como ya se había comprobado para los hidrogeles sintetizados para FA, no se obtuvo respuesta en presencia de furfural (Figura 45). En medios grasos, como los aceites vegetales, el furfural parece que no penetra en la membrana, dado que no se produce el cambio de color, por lo que no es posible su determinación en estas condiciones.

En conclusión, las membranas sensoras sintetizadas pueden aplicarse a la determinación de furfural en un amplio abanico de alimentos. No obstante, aunque los simulantes permiten estimar el comportamiento de los materiales y los analitos en dichos medios, no tienen en cuenta a los componentes de la matriz, que podrían interferir en la medida. Es por ello que, para aplicar este método en distintos alimentos, debería evaluarse la respuesta de las membranas sensoras en las matrices correspondientes, de manera que se confirmaran las estimaciones realizadas en los simulantes alimentarios.

8.2.6. Validación mediante HPLC-DAD

Dado que no se disponía de materiales de referencia certificados se decidió llevar a cabo la validación del método comparando los resultados obtenidos con el sensor con los proporcionados por una técnica cromatográfica (HPLC-DAD).

Para llevar a cabo la validación del método se prepararon disoluciones de furfural en H₂O:EtOH (80:20, *v/v*) en el intervalo de concentraciones 75 – 500 µg·L⁻¹. En la Figura 46 se muestran los calibrados obtenidos con ambos métodos.

Para comparar los resultados obtenidos con ambos métodos se aplicó el método de mínimos cuadrados bivariados (BLS, del inglés *bivariate least-square*), que permite calcular los parámetros de la recta de regresión considerando, simultáneamente, los errores de la variable dependiente y de la variable independiente. Para calcular la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de regresión aplicando el método BLS se aplicó un proceso iterativo, utilizando un algoritmo programado empleando el programa SigmaPlot 11.0.

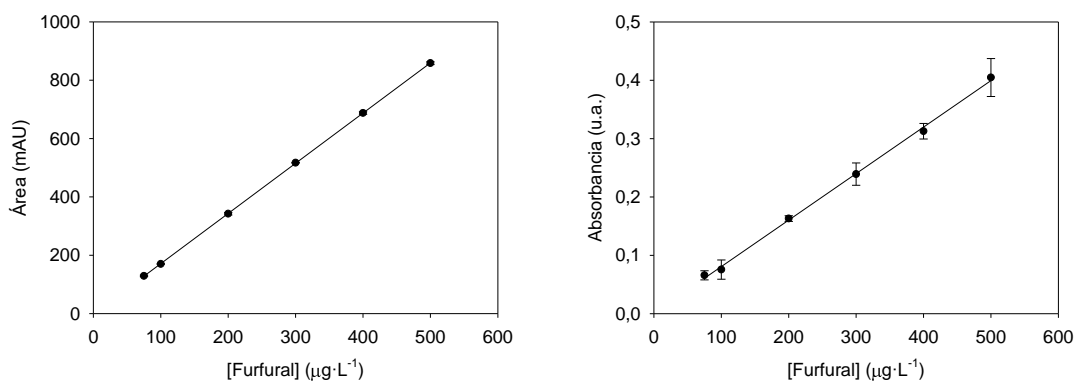


Figura 46. Calibrados obtenidos con el método cromatográfico (HPLC-DAD, izquierda) y las membranas sensoras (derecha) para el intervalo de concentración 75 - 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural en EtOH 20 % (v/v) ($n = 3$).

En la Figura 47A se muestra la recta de regresión BLS que compara los resultados obtenidos con ambos métodos.

Se calculó el intervalo de confianza conjunto para la ordenada en el origen y la pendiente correspondiente a la recta de regresión obtenida, para un nivel de probabilidad del 95%. Como se observa en la Figura 47B, el valor de referencia de la ordenada en el origen y de la pendiente (0, 1) estaban incluidos dentro del intervalo de confianza conjunto, definido por la elipse, y calculado a partir de los datos experimentales. Se pudo por tanto afirmar que el sensor óptico desarrollado presentaba resultados comparables a los obtenidos mediante el método de referencia, para la determinación de furfural en muestras de $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ (80:20, v/v).

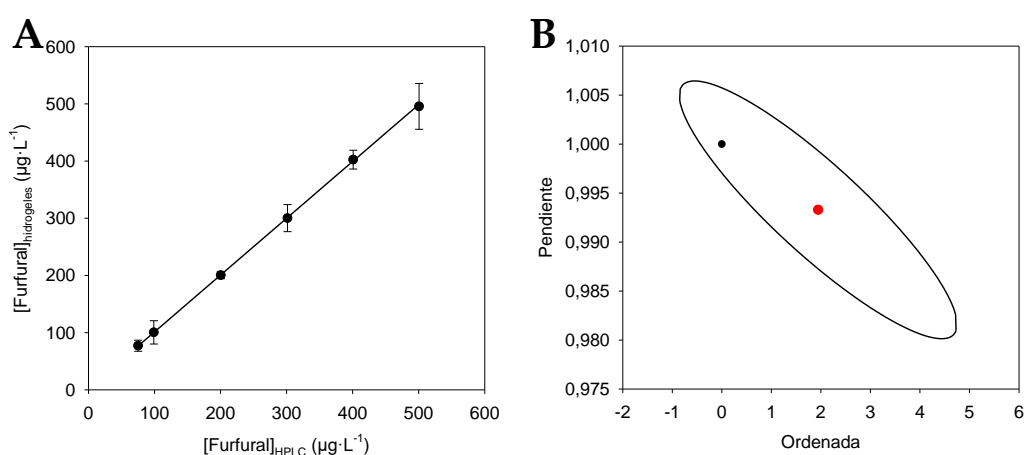


Figura 47. A) Representación conjunta de los valores de concentración de furfural estimados mediante HPLC-DAD y las membranas sensoras, así como la incertidumbre de ambos métodos para cada nivel de concentración. B) Elipse que representa el intervalo de confianza conjunto de la ordenada en el origen y la pendiente del ajuste de los resultados. Punto rojo: valores experimentales. Punto negro: valores teóricos. Puesto que los valores teóricos quedan dentro del área delimitada por la figura geométrica, ambos métodos son comparables a un nivel de confianza del 95%.

8.2.7. Análisis de furfural en muestras de cerveza aplicando el método de las adiciones estándar

Una vez validado el método y demostrada su aplicabilidad en varios simulantes, las membranas sensoras se aplicaron al análisis de muestras reales de cerveza, tras diferentes tiempos de almacenamiento, para evaluar si existía o no una relación lineal entre el contenido de furfural y dicho parámetro. En el apartado de 7.2.3.4. se describe el método para el análisis de las muestras de cerveza proporcionadas por Mahou-San Miguel empleando el método de calibración externa. En paralelo, las muestras se analizaron empleando el método de adiciones estándar con el objeto de descartar el efecto matriz.

Para ello se prepararon tres calibrados independientes por cada una de las cuatro muestras ensayadas (A, B, C y D) y por analista ($n = 9$), empleando una disolución patrón de furfural de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para la obtención de los calibrados, en un matraz aforado de 10 mL se adicionó el volumen correspondiente de la disolución patrón de furfural, 9.850 mL de la muestra de cerveza y se enrasó con una mezcla de $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ (94.6:5.4, v/v), adicionando previamente HCl en todos los patrones de calibrado. El intervalo de concentraciones del calibrado de adiciones estándar se seleccionó teniendo en cuenta la concentración de furfural determinada mediante calibración externa para cada una de las muestras ensayadas.

Una vez obtenidos los calibrados se calculó por extrapolación la concentración de furfural en cada muestra, promediándose los resultados obtenidos por tres analistas ($n = 9$). Se comprobó la buena reproducibilidad de los resultados obtenidos ($\text{RSD} < 16\%$). En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

Tabla 15. Concentraciones de furfural en las muestras de cerveza, en función del tiempo de almacenamiento.

Almacenamiento (días)	29	167	265	609
[Furfural]* ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	124 ± 18	295 ± 32	336 ± 38	798 ± 86
RSD (%)	16	13	14	13

*($\pm \text{ts}/\sqrt{n}$, $n = 9$; 95%)

La comparación estadística de ambos métodos confirma que la precisión de los resultados obtenidos mediante el método de calibración externa es superior a los calculados mediante el método de adiciones estándar. Esto es debido a que en el segundo caso, el cálculo de concentraciones se realizó mediante extrapolación, lo que implica una mayor incertidumbre. Como se muestra en la Figura 48A hay una correlación lineal entre el tiempo de almacenamiento y la concentración de furfural, como se ha descrito anteriormente.⁴²⁷ Además, se confirma que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos (Figura 48B). Por tanto, se demuestra la utilidad del método desarrollado para determinar de forma simple, sencilla y rápida la frescura de la cerveza, así como para el control de la calidad de la misma durante su almacenamiento.

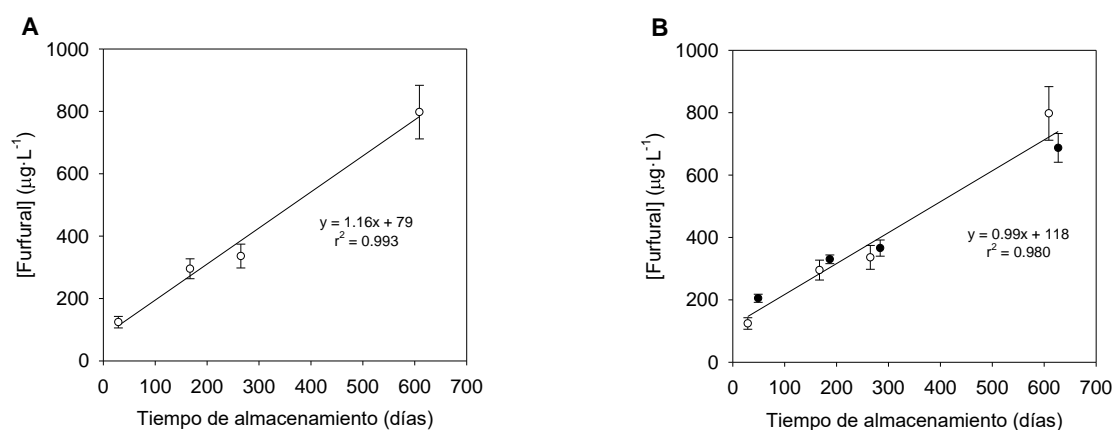


Figura 48. A) Correlación entre la concentración de furfural en las muestras de cerveza, calculadas mediante el método de adiciones estándar, y los días de almacenamiento. La correlación lineal se confirma mediante el valor de r^2 (0.993). B) Correlación entre la concentración de furfural en las muestras de cerveza, calculadas mediante el método de calibración externa (negro) y de adiciones estándar (blanco), y los días de almacenamiento.

8.3. Síntesis y aplicación de MIPs selectivos a alternariol y a su monometil éter al desarrollo de métodos analíticos para la determinación de dichas micotoxinas en alimentos

En este apartado se describen los aspectos más relevantes de la síntesis de MIPs selectivos a alternariol (AOH) y a su monometil éter (AME), así como su aplicación como materiales de reconocimiento selectivo para la extracción en fase sólida de estos compuestos (MISPE) en muestras de alimentos. En concreto se ha puesto a punto un método para el análisis de las micotoxinas en tomate triturado basado en extracción con disolventes presurizados (PLE), preconcentración con MISPE y análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia con detección de fluorescencia (HPLC-FLD) (apartado 7.4.). El método MISPE se ha aplicado asimismo a la limpieza y preconcentración de muestras comerciales de zumo de tomate, concentrado de tomate y aceite de sésamo extraídas mediante QuEChERS para su posterior análisis mediante cromatografía de líquidos de ultra eficacia con detección por espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) (apartado 7.3.).

Los polímeros selectivos a AOH y AME se sintetizaron utilizando una plantilla relacionada estructuralmente con las micotoxinas. Como se ha indicado anteriormente, el empleo de un compuesto análogo al analito para esta aplicación permite minimizar los riesgos derivados del uso de moléculas potencialmente tóxicas durante el proceso de impronta, evitar la aparición de falsos positivos durante la preconcentración y reducir los costes asociados al empleo de las micotoxinas, cuyo precio es relativamente elevado, durante la etapa de síntesis. La selección de la molécula plantilla parte de trabajos realizados anteriormente en el grupo de investigación. Concretamente, se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron una batería de moléculas relacionadas estructuralmente con el alternariol y su monometil éter, así como una biblioteca de polímeros variando la composición del monómero funcional y del entrecruzante empleados en la síntesis del MIP.²⁶ A partir de estos estudios se seleccionó la 8,9-trihidroxi-6*H*-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona (S2) como plantilla para la síntesis de los polímeros selectivos.^{43,428} Como se comentó en el apartado 7.3.1., aunque no se había planificado inicialmente, la molécula diseñada resultó ser la urolitina C, un derivado del ácido elágico que se produce tras la ingestión

de ciertas bayas o frutos secos y que no es tóxica para los seres vivos, lo que resulta de gran importancia para la síntesis de los MIPs en términos de seguridad.⁴²⁹ Como se ha indicado anteriormente, en un trabajo previo, se sintetizó un MIP empleando esta molécula plantilla y *N*-(2-aminoetil)metacrilamida (EAMA) como monómero funcional.⁴³ No obstante, los resultados obtenidos con la biblioteca de polímeros, mencionada anteriormente, demostraron que el empleo de 4-vinilpiridina (VIPY) como monómero funcional también permitía obtener MIPs selectivos al alternariol y a su monometil éter. De hecho, los polímeros sintetizados con este monómero presentaban características diferentes en términos de preconcentración de las micotoxinas respecto a los MIPs obtenidos con EAMA. Por todo ello se decidió llevar a cabo la síntesis, caracterización y aplicación de los MIPs preparados con VIPY, para la determinación de las micotoxinas seleccionadas en alimentos, como se describe en los trabajos recogidos en los apartados 7.3 y 7.4.

8.3.1. Estudio de interacciones de la molécula plantilla con VIPY mediante ¹H RMN

Las interacciones entre la molécula plantilla, S2, y el monómero funcional, VIPY, se caracterizaron mediante ¹H RMN. El estudio se realizó en DMSO dado que era el disolvente utilizado para la síntesis del MIP (apartado 7.3.2.5.) y porque, además, permite observar con cierta facilidad las señales los protones intercambiables de los grupos OH. Debido a su gran capacidad de solvatación, el DMSO reduce significativamente la velocidad de intercambio de los protones móviles, lo que permite obtener señales más estrechas. Por otra parte, en este disolvente la resonancia de los protones de los grupos OH se observa fuera de la región aromática, lo que facilita su identificación.⁴³⁰

Se asignaron las señales correspondientes a S2 en DMSO como se detalla a continuación (el superíndice de los H indica la numeración asignada, Figura 49): δ (ppm): 10.38 (s, 1H², OH), 10.12 (s, 1H⁶, OH), 10.02 (s, 1H⁷, OH), 7.86-7.83 (d, J = 8.8 Hz, 1H⁴), 7.49 (s, 1H⁸), 7.44 (s, 1H⁵), 5.83-5.77 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H³), 6.69-6.68 (d, J = 2.4 Hz, 1H¹).

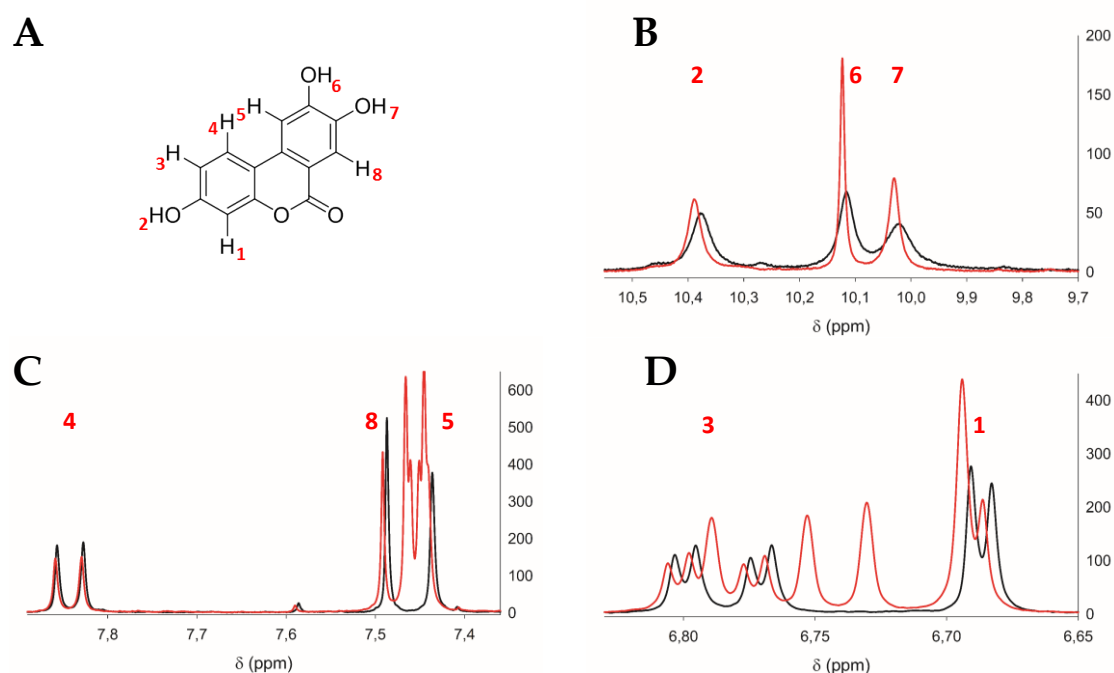


Figura 49. A) Estructura del S2 con la numeración correspondiente a los hidrógenos. B, C, D) Ampliaciones del espectro de ^1H RMN comparando el espectro de S2 (negro) y el espectro de S2 y VIPY (rojo) en DMSO-d_6 . Las señales están numeradas en correspondencia con los protones descritos en A.

Una vez asignadas las señales se evaluaron los desplazamientos producidos tras adicionar cantidades crecientes del monómero funcional sobre una disolución de la molécula plantilla en DMSO-d_6 . En primer lugar, se observó un desplazamiento de aprox. 0.01 ppm de las señales de los protones de los grupos OH (Figura 49B), lo que podría indicar una la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo amino de la VIPY y los grupos OH del S2. Además, se apreció un ligero estrechamiento en las señales correspondientes, lo que podría indicar que el intercambio con el disolvente no sería tan rápido debido a la interacción mencionada anteriormente. Por lo que respecta a las señales adyacentes a estos grupos, 1 y 3 (Figura 49D) y 5 y 8 (Figura 49C), se apreciaron desplazamientos mayores en éstos últimos (0.002 y 0.004 ppm, respectivamente), posiblemente debido a que la interacción se produce con los dos grupos OH en lugar de uno. Finalmente, el protón 4 no presentó desplazamiento significativo, posiblemente por la lejanía de los grupos funcionales implicados en la interacción, o porque las interacciones no eran lo suficientemente fuertes. De esta manera se demostró la existencia de interacciones por enlace de hidrógeno entre el monómero funcional y la molécula plantilla identificándose los grupos funcionales involucrados en las mismas.

8.3.2. Aplicación de los MIPs al análisis de alternariol y su monometil éter en alimentos empleando QuEChERS-MISPE-UPLC-MS/MS

A continuación, se procedió a la síntesis del MIP P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA). Este polímero se aplicó a la limpieza y preconcentración de muestras comerciales de zumo de tomate, concentrado de tomate y aceite de sésamo extraídas mediante QuEChERS para su posterior análisis mediante UPLC-MS/MS.

Los estudios de validación y aplicación del método utilizando UPLC-MS/MS, así como el trabajo descrito en el apartado 7.3., se realizaron durante una estancia predoctoral en el Laboratorio de Análisis de los Alimentos de la Universidad de Gante bajo la dirección de la profesora Sarah de Saeger. Este grupo es conocido internacionalmente por sus aportaciones al desarrollo de métodos para el análisis de micotoxinas en alimentos, así como en estudios de concurrencia y metabolómica.^{81,121,136,431}

Durante la estancia, y el trabajo posterior realizado en colaboración con un miembro del equipo de la Dr. de Saeger, se compararon las características de los polímeros sintetizados con EAMA y VIPY, empleando la misma molécula plantilla, para la extracción selectiva de las micotoxinas estudiadas y otras micotoxinas modificadas de *Alternaria*.

8.3.2.1. Comparación de los MIPs sintetizados con VIPY y EAMA

Tras optimizar y caracterizar el MIP basado en VIPY (ver apartado 7.3.3.), se compararon las características analíticas de este material con el obtenido empleando EAMA, como monómero funcional,⁴³ a fin de determinar la influencia de la naturaleza del monómero en el reconocimiento de la plantilla y en las características del MIP en el proceso MISPE.

Se determinaron los límites de detección y cuantificación, así como el intervalo lineal, el límite de decisión (CC_α) y la capacidad de detección (CC_β) con ambos polímeros en diferentes matrices de alimentos (apartado 7.3.3.4.). En ambos casos se alcanzaron límites de detección del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, no obstante, el polímero basado en VIPY permitió detectar y cuantificar concentraciones de AOH y AME en las matrices

ensayadas hasta tres veces inferiores a las obtenidas con el polímero sintetizado con EAMA (Tabla 1, apartado 7.3.3.4.).

Para confirmar las diferencias existentes, en términos de selectividad y capacidad de carga, se evaluaron las isotermas de adsorción de ambos polímeros. En el caso de P(EAMA-*co*-MAM-*co*-EDMA) se comprobó que existían mayores diferencias entre el MIP y el NIP, lo que indicaba una mayor selectividad frente a los analitos de interés.⁴³ Sin embargo, el polímero P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA) mostraba mayor capacidad de carga que el anterior MIP (apartado 7.3.3.3.). Por todo ello para los siguientes trabajos, se decidió emplear el polímero P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA) dado que, a pesar de mostrar una menor retención selectiva frente al NIP, presentaba una mayor capacidad de preconcentración.

Las diferencias encontradas en la retención específica (MIP *vs* NIP) de ambos polímeros podrían justificarse teniendo en cuenta que el EAMA, al igual que el EDMA, empleado como entrecruzante, son monómeros de tipo metacrílico, mientras que la VIPY es vinílico. La velocidad de polimerización de ambos es diferente, lo que podría dar lugar a una distinta distribución de grupos funcionales en la red polimérica.³²¹ Por otra parte, las interacciones específicas entre el analito y el EAMA implican fundamentalmente al grupo amino del monómero, mientras que en el caso de la VIPY pueden producirse también interacciones de tipo $\pi \rightarrow \pi$ con los anillos aromáticos del analito. No obstante, estas interacciones suelen originar un incremento de las interacciones no específicas en el NIP, especialmente cuando se trabaja en medio acuoso, que es lo que se observa en este caso.³⁰⁸

Por otra parte, debe tenerse en cuenta la hidrofobicidad de los analitos presentes en la muestra. Como se comprobó en los estudios de reactividad cruzada (apartado 7.3.3.2.) las moléculas con un elevado log P, como AME (log P = 3,9; $R_{\text{AME-NIP}} = 92\%$), se retienen inespecíficamente en el NIP. El α -ZOL que también contiene un grupo éster resorcílico y es hidrofóbico (log P = 4,2), se retiene en el MIP y, en menor proporción, en el NIP, ($R_{\alpha\text{-ZOL-MIP}} = 101\%$; $R_{\alpha\text{-ZOL-NIP}} = 77\%$). Este comportamiento de AME también se observó para el polímero P(EAMA-*co*-MAM-*co*-EDMA), aunque las retenciones no

específicas en el NIP fueron superiores en el caso del P(VIPY-co-MAM-co-EDMA), lo que se atribuye al mayor carácter hidrofóbico del monómero funcional.

A la hora de seleccionar un polímero u otro debe tenerse en cuenta la aplicación final. El P(VIPY-co-MAM-co-EDMA) permite cargar volúmenes de muestra mayores (hasta 25 mL) y la determinación de AOH y AME a niveles de concentración más bajos, y en intervalos más amplios. Por otra parte, el polímero basado en EAMA permite obtener extractos más limpios y una mayor especificidad, lo cual puede ser interesante para el análisis de matrices muy complejas, o en aquellas donde las interferencias pudieran suponer un problema importante. En nuestro caso se decidió emplear el P(VIPY-co-MAM-co-EDMA) para poner a punto el método de análisis de AOH y AME en zumo de tomate, concentrado de tomate y aceite de sésamo.

8.3.2.2. Análisis de micotoxinas modificadas de *Alternaria*

Si bien existe un gran interés en la determinación de AOH y AME, debido a su elevada toxicidad y a la ausencia de legislación respecto a su presencia, en los últimos años se ha ampliado el estudio a otras moléculas derivadas de estas micotoxinas. Se denominan “micotoxinas enmascaradas” o, más correctamente, “micotoxinas modificadas” y se trata de conjugados de dichos analitos con moléculas de glucosa, sulfatos, u otros azúcares metabolizados por las plantas. Actualmente se desconoce el alcance de los efectos de dichas micotoxinas, que una vez ingeridas pueden metabolizarse liberando la molécula original en el organismo. Es por ello que la EFSA ha recomendado el desarrollo de métodos de análisis que permitan su determinación de manera sensible y fiable. Otra de las limitaciones con la que nos encontramos actualmente es la ausencia de patrones que permitan el desarrollo de dichos métodos. Para evitar este problema algunos grupos han abordado la síntesis de los conjugados correspondientes a las micotoxinas derivadas del género *Alternaria*, lo que facilita el análisis multianalito.¹⁰³

Por esta razón se decidió evaluar la respuesta de los MIPs sintetizados y su potencial aplicación en el análisis de micotoxinas modificadas de *Alternaria*. En este estudio se analizaron derivados de AOH y AME, en sus formas glicosidadas y sulfatadas

en la posición 3 así como otras micotoxinas de *Alternaria* que no se habían podido analizar previamente como altenueno (ALT) y la tentoxina (TEN) (Figura 50).

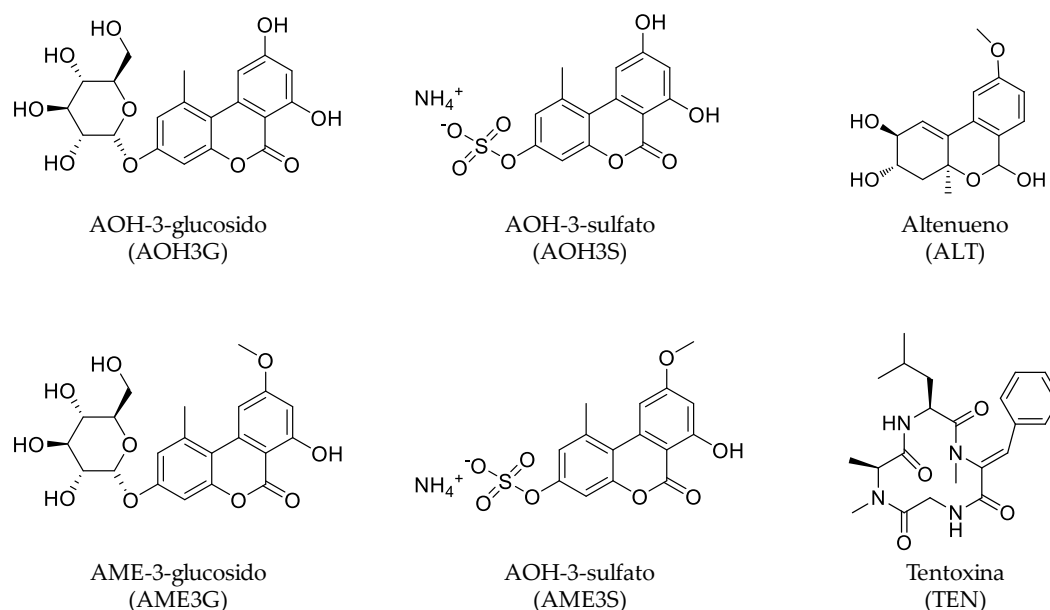


Figura 50. Estructura de las micotoxinas modificadas de *Alternaria* AOH-3-glucosido (AOH3G), AME-3-glucosido (AME3G), AOH-3-sulfato (AOH3S), AME-3-sulfato (AME3S) y de altenueno (ALT) y tentoxina (TEN).

Para el estudio se prepararon disoluciones que contenían las diferentes micotoxinas en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en matrices de zumo y concentrado de tomate, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.3.2.6. En la Figura 51 se muestran los resultados obtenidos para los calibrados de AOH, AME, AOH3G, AOH3S, AME3G, AME3S, TEN y ALT en las matrices mencionadas anteriormente.

En el caso de AOH y AME tanto la linealidad como la reproducibilidad eran muy buenas en ambas matrices, dado que el método MISPE se había optimizado para su determinación. En el caso de las moléculas modificadas hay que tener en cuenta que la modificación se hizo en el carbono 3, lo que eliminaba uno de los puntos de reconocimiento de la plantilla, como se concluyó a partir de los experimentos de ^1H RMN.

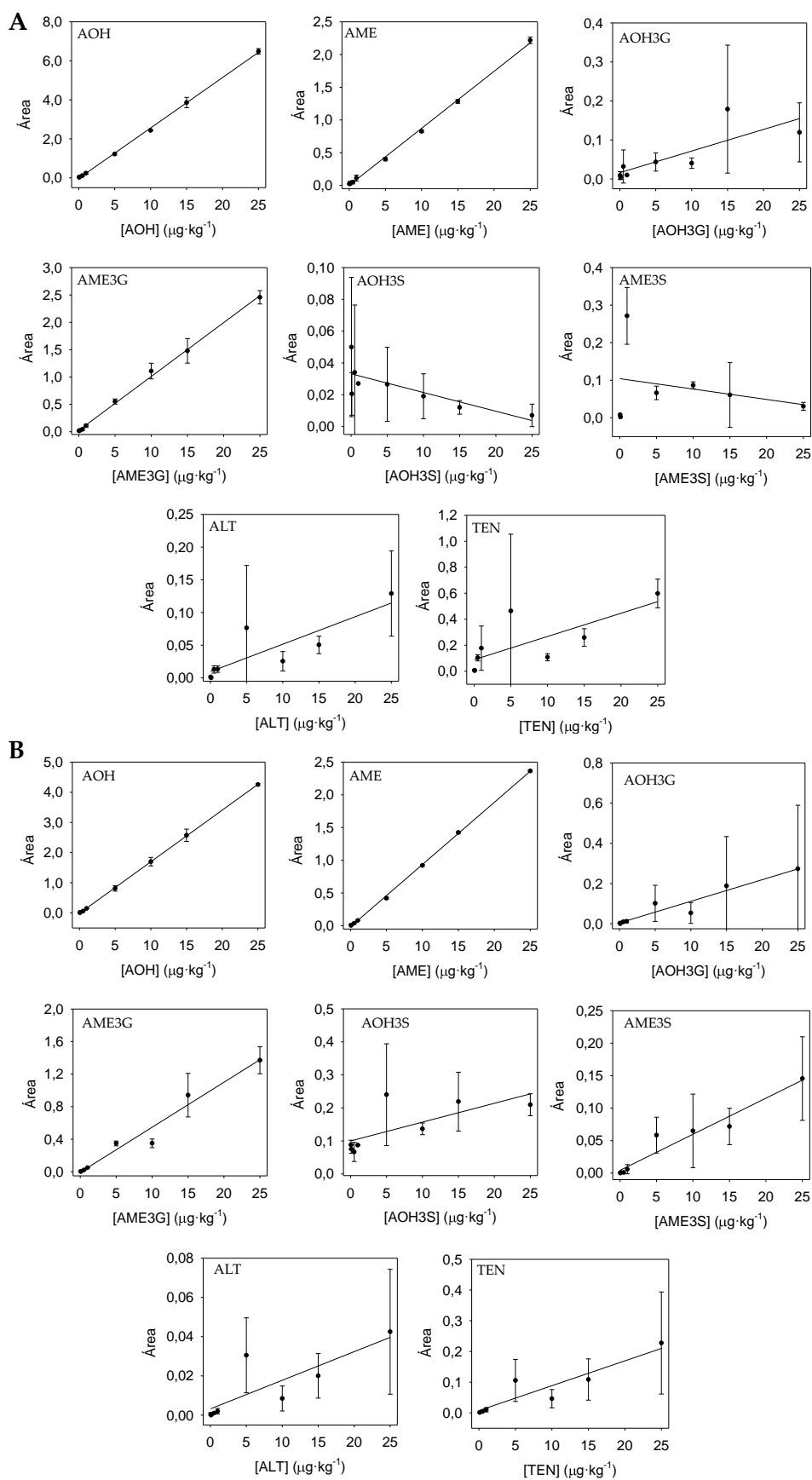


Figura 51. Curvas de calibrado obtenidas para AOH, AME, AOH3G, AME3G, AOH3S, AME3S, ALT Y TEN, en zumo (A) y concentrado de tomate (B). Las concentraciones de todas las micotoxinas se encontraban entre 0.05 y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En el caso de las formas glicosidadas, el AOH3G presentó una baja retención y una elevada irreproducibilidad en ambas matrices, obteniéndose bajas sensibilidades con respecto al AOH. Por otro lado, el AME3G mostró un comportamiento similar al AME en zumo de tomate, aunque la reproducibilidad disminuyó ligeramente. La sensibilidad también disminuyó para las medidas realizadas en concentrado de tomate. Por una parte, la presencia de glucosa en la molécula puede afectar a la retención de este compuesto en el MIP, dado el mayor tamaño de la molécula que dificultaría su acceso a los sitios de unión. No obstante, como se ha indicado anteriormente, la retención de AME en el polímero tiene un elevado componente de interacciones hidrofóbicas, lo que justificaría la interacción del AME3G con el MIP.

Las formas sulfatadas, además de presentar una estructura diferente, se encuentran cargadas, lo que puede influir en la interacción con el polímero en las condiciones MISPE optimizadas. Además, es posible que estas moléculas presenten mayor afinidad por el disolvente acuoso utilizado en la carga y el lavado del proceso MISPE, lo que favorecería su elución del MIP durante las etapas correspondientes. Todo ello se traduciría en una disminución de las recuperaciones y una elevada irreproducibilidad, que es lo que se observa en la Figura 51. El análisis de estos compuestos requeriría modificar las condiciones del método MISPE para la preconcentración de estos compuestos.

Tanto el ALT como la TEN presentaron comportamientos similares en ambas matrices con recuperaciones bajas y elevada irreproducibilidad. En el caso de la primera, cabría esperar que la similitud estructural con AOH y AME resultase en un reconocimiento aceptable. No obstante, como se dedujo de los experimentos de ^1H RMN, la disposición de los grupos OH responsables de la interacción es de gran importancia a la hora del reconocimiento. En el ALT los grupos OH se encuentran en diferentes posiciones al AOH, por lo que las interacciones específicas no se pueden producir de la misma manera que con la plantilla, aunque sí se conservarían las interacciones π - π . En el caso de la TEN su estructura es muy diferente a la molécula plantilla, de manera que el escaso reconocimiento observado puede atribuirse exclusivamente a interacciones no específicas. En ambos casos, se demuestra la importancia del concepto de impronta para el reconocimiento selectivo en el polímero.

Posteriormente, durante la validación del método también se analizaron las moléculas mencionadas anteriormente y se comprobó que solo se lograban buenos resultados con AOH y AME. Para el resto de micotoxinas los calibrados obtenidos carecían de la sensibilidad y reproducibilidad adecuadas para su validación. De esta manera se comprobó la buena selectividad de los polímeros frente AOH y AME.

8.3.3. Aplicación de los MIPs a la determinación de AOH y AME en muestras de tomate triturado empleando PLE-MISPE-HPLC-FLD

En paralelo a los estudios descritos en el apartado 8.3.2., se optimizó un método de extracción con disolventes presurizados (PLE) para la extracción de AOH y AME de muestras de tomate. El extracto se preconcentró empleando los cartuchos de P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA) descritos anteriormente y el análisis de las micotoxinas se llevó a cabo mediante HPLC-FLD.⁴³

En este trabajo se optimizaron los parámetros que afectan a la extracción de AME y AOH empleando PLE (concretamente la composición del disolvente, la temperatura, la presión y el número de ciclos), tal y como se detalla en el apartado 7.4.3.1. Para llevar a cabo la optimización, se tuvo en cuenta la compatibilidad entre los disolventes empleados en el PLE y en el MISPE. Las condiciones optimizadas para obtener una extracción cuantitativa de los analitos (Tabla 5, apartado 7.4.5.2.) implicaban el uso de un 25% de MeOH en el medio de extracción. Dado que la presencia de este disolvente orgánico es incompatible con la retención selectiva de las micotoxinas en el cartucho MISPE, se decidió evaporar esta fracción de disolvente orgánico y reconstituir las muestras en tampón fosfato (50 mM, pH 8.2) antes de su carga en el cartucho. Seguidamente, las muestras se filtraron empleando una frita de SPE, tras confirmar que las micotoxinas no se retenían en este material.

Para evaluar la reproducibilidad y la eficacia de las distintas etapas del proceso (PLE-MISPE) de extracción y preconcentración (Figura 52) se compararon las recuperaciones obtenidas tras enriquecer la muestra con AOH y AME antes de la extracción; tras la extracción PLE, considerando las etapas de evaporación y filtración y, por último, tras el proceso MISPE. De esta manera se podían evaluar las pérdidas originadas en las diferentes etapas y determinar cuál de ellas era la más crítica.

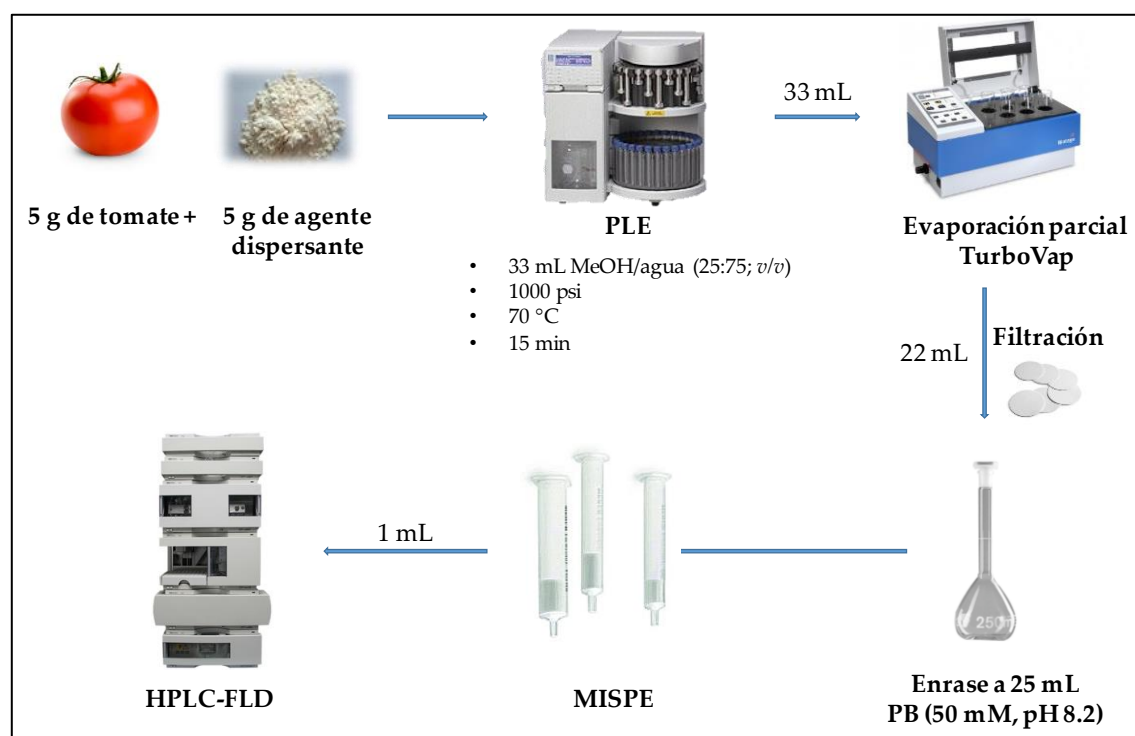


Figura 52. Esquema del método PLE-MISPE-HPLC-FLD para la determinación de AOH y AME.

De esta manera se obtuvieron los calibrados para AOH y AME que se muestran en la Figura 53. Se comprobó que no existían diferencias significativas, a un nivel de probabilidad del 95%, cuando las muestras se salpicaban con las micotoxinas antes o después del MISPE. Sin embargo, se observaron pérdidas de, aproximadamente, el 30% y el 50% para AOH y AME, respectivamente, tras las etapas de extracción PLE, evaporación, filtrado y reconstitución.

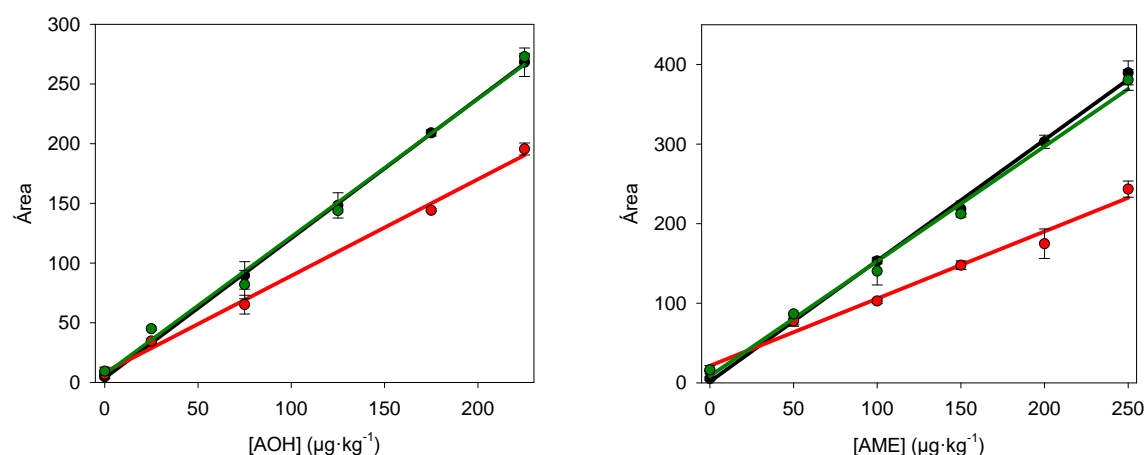


Figura 53. Curvas de calibrado obtenidas tras enriquecer la muestra con AOH (izda.) y AME (dcha.) y aplicar el método PLE-MISPE-HPLC-FLD. Las fortificaciones se realizaron sobre una muestra de tomate antes de la extracción PLE (rojo), antes del proceso MISPE (verde) y tras el proceso MISPE (negro).

A fin de investigar en qué etapa del proceso de extracción se estaba produciendo la pérdida de los analitos, se evaluaron en primer lugar las recuperaciones obtenidas tras el PLE. Para ello se fortificaron tres muestras de tomate con $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y se extrajeron, tal y como se explica en el apartado 7.4.2.5., llevándolas a un volumen final de 50 mL y, tras filtrarlas, se inyectaron en el HPLC. En los tres casos se obtuvieron recuperaciones cuantitativas, como se muestra en la Tabla 5 (apartado 7.4.5.2.) y en la Figura 54, tanto para AOH como para AME. Es por ello que se concluyó que las pérdidas se producían en la etapa de evaporación de los extractos.

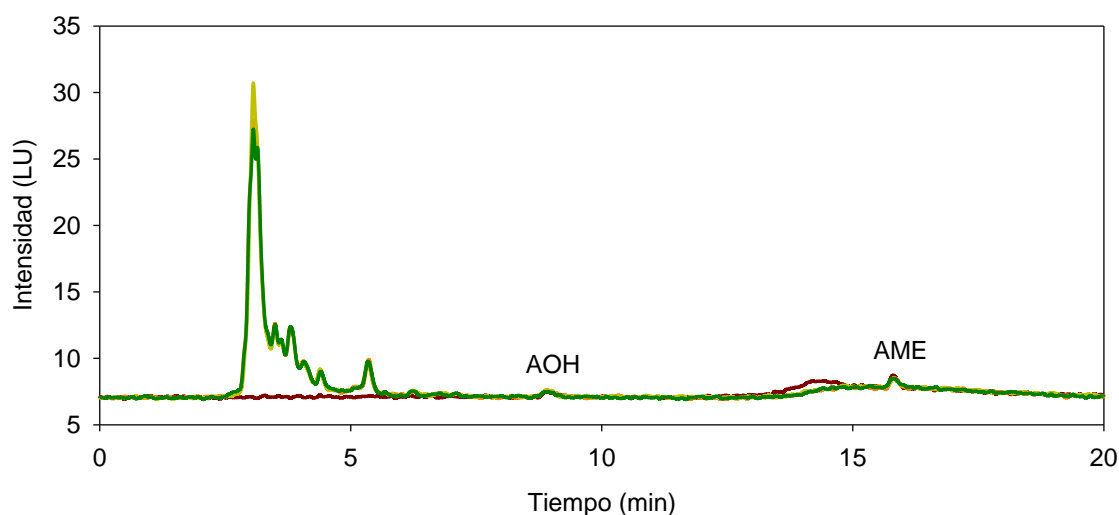


Figura 54. Cromatogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de tomate fortificada con $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de AOH y AME. Las muestras se extrajeron según las condiciones de la tabla 1 (apartado 7.4.2.5.), se llevaron a un volumen de 50 mL y se filtraron antes de su inyección en el HPLC-FLD. En marrón se indica el cromatograma de referencia y en verde, ocre y naranja los cromatogramas de las tres muestras fortificadas.

A la vista de los resultados obtenidos se concluyó que la solubilidad del AOH y el AME disminuía al hacerlo la concentración de metanol en el disolvente de extracción, de forma que la micotoxinas precipitaban y quedaban retenidas en la frita. Para confirmar este hecho se compararon las recuperaciones obtenidas para una muestra fortificada con AOH y AME tras la extracción y filtrada antes, o después, de la evaporación. Se comprobó que las recuperaciones obtenidas realizando el filtrado antes de la evaporación, eran cercanas al 100% para AOH ($R_{\text{AOH}} = 90\%$; $\text{RSD} = 3\%$; $n = 3$), disminuyendo en el caso de AME ($R_{\text{AME}} = 62\%$; $\text{RSD} = 8\%$; $n = 3$). Cuando el filtrado se realizó después de la evaporación los resultados obtenidos eran similares a los mencionados anteriormente, con pérdidas en las recuperaciones de 30% y el 50% para AOH y AME, respectivamente. Se concluyó así que la evaporación del MeOH disminuía

la solubilidad de las de los micotoxinas en los extractos y favorecía la precipitación parcial de las mismas, disminuyendo su recuperación.

Se confirmó que los cartuchos del MIP, P(VIPY-co-MAM-co-EDMA), toleraban la presencia de una pequeña cantidad de MeOH en la etapa de carga de la muestra, sin que se observase la elución de las micotoxinas durante la misma. La adición de 100 μL de MeOH a la disolución (22 mL) obtenida tras la evaporación del extracto del PLE, antes de la filtración, incrementó la solubilidad de AOH y AME en el medio evitando su precipitación. Como se muestra en la Figura 55, no existen diferencias significativas entre los calibrados obtenidos para el AOH en estas condiciones o salpicando los extractos obtenidos tras la extracción de un blanco. No obstante, en el caso del AME se obtuvieron recuperaciones del 70%, que mejoraban los valores obtenidos inicialmente sin la adición de MeOH, pero inferiores al 100%. Este comportamiento puede atribuirse a la baja solubilidad del AME en medio acuoso. Este problema podría evitarse incrementando la concentración de MeOH en la disolución de carga de la muestra, sin embargo, en esas condiciones disminuiría la eficacia del proceso MISPE.

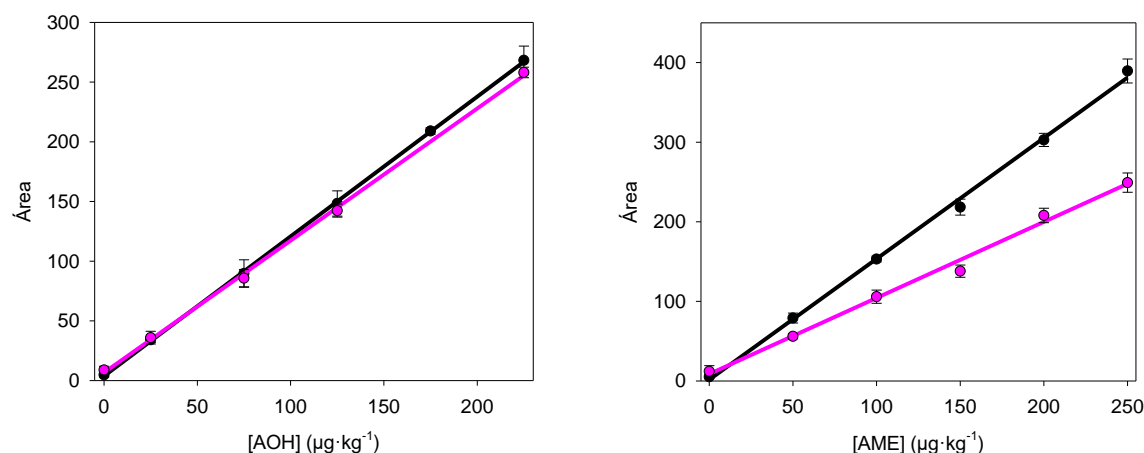


Figura 55. Curvas de calibrado obtenidas tras fortificar con AOH (izda.) y AME (dcha.) una muestra de tomate y aplicar el método PLE-MISPE-HPLC-FLD, añadiendo 100 μL de MeOH tras la evaporación (rosa). En negro se muestra el calibrado obtenido salpicando los extractos obtenidos tras la extracción de un blanco.

Por todo ello se decidió trabajar en las condiciones optimizadas asumiendo las pérdidas de AME durante la etapa de evaporación y filtración posteriores al PLE. En cualquier caso, las características analíticas del método desarrollado combinando PLE y MISPE mejoran, o son comparables, a las de otros métodos descritos en la bibliografía para la determinación de estas micotoxinas (ver Tabla 6, apartado 7.4.5.3.).^{107,97}

En conclusión, la investigación realizada en el curso de la presente Tesis Doctoral demuestra las ventajas del uso de los MIPs, en comparación con los adsorbentes de extracción en fase sólida comerciales, para el análisis de micotoxinas de la familia de la *Alternaria*. Entre ellas podríamos destacar su utilidad para la limpieza de muestras complejas, su selectividad, su reutilización durante un número elevado de ensayos (mínimo 30) y su bajo coste. Además, el empleo de los MIPs es compatible con otras técnicas de extracción (PLE) y análisis de muestras (HPLC-FLD, HPLC-MS/MS) permitiendo la determinación de AOH y AME en muestras contaminadas naturalmente a bajos niveles de concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

8.4. Síntesis de MIPs selectivos a ácido tenuazónico y aplicación al desarrollo de sensores ópticos

El ácido tenuazónico (TeA) es una de las micotoxinas que más interés ha suscitado en los últimos años debido a su elevada toxicidad.⁴³² Al igual que sucede con el AOH y AME, la Unión Europea (UE) no ha fijado hasta la fecha los límites máximos permitidos en alimentos. Actualmente se encuentran en fase de estudio los valores de referencia toxicológicos y la EU ha realizado diversas llamadas y recomendaciones para desarrollar métodos analíticos que permitan la detección de estos compuestos con una gran sensibilidad.⁴³² El TeA pertenece al grupo de los ácidos tetrámicos, un grupo de compuestos bien conocidos por su capacidad de coordinarse a iones metálicos gracias a la presencia del heterociclo 3-acetilpirrolidina-2,4-diona. Se ha descrito la formación de complejos entre el TeA y cationes Fe(III), Ni(II), Mg(II) y Cu(II),⁴³³ siendo este último el metal con el que se encuentra coordinado en su forma comercial.

La luminiscencia de los lantánidos, concretamente del Eu(III), se relaciona con transiciones que involucran estados electrónicos originados a partir de configuraciones $4f^n$, de forma que las líneas de emisión no suelen estar muy afectadas por la naturaleza de los ligandos.⁴³⁴ Para evitar el problema asociado a la baja absorción, y por tanto a la baja emisión de estos compuestos, se recurre al empleo de ligandos, como las β -dicetonas, que originan el denominado efecto antena o de sensibilización luminiscente. De esta forma, la energía absorbida por el ligando en la región UV se transfiere al ion metálico, contribuyendo a aumentar la eficiencia de la emisión.^{434,435} Los tiempos de vida de emisión de fosforescencia se encuentran en el intervalo de 10^{-5} – 10^{-8} s, lo que permite reducir los problemas derivados de la dispersión de radiación e incrementar los tiempos de integración, aumentando la relación señal/ruido.^{317,436} Aprovechando estas propiedades se han sintetizado MIPs basados la formación de compuestos de coordinación con cationes metálicos, que se han utilizado para la determinación espectrofotométrica de diversos compuestos, gracias a la emisión del complejo de Eu en presencia del analito de interés.^{319,437}

Con estos antecedentes se decidió desarrollar sensores ópticos luminiscentes basados en MIPs selectivos a TeA utilizando Eu(III) como ion metálico y una impronta

por coordinación. La síntesis de este polímero es totalmente novedosa ya que, hasta la fecha, no se han publicado MIPs selectivos a TeA y mucho menos plataformas sensoras para su determinación. Para la síntesis de estos polímeros se siguieron dos aproximaciones diferentes: 1) síntesis de MIPs en formato de microesferas porosas utilizando moldes de gel de sílice sacrificables y, 2) síntesis de partículas núcleo recubrimiento del tipo SiO₂@MIP.

8.4.1. Síntesis de MIPs selectivos a TeA en formato de microesferas porosas

Los MIPs en formato de microesferas porosas han demostrado ser de gran utilidad para la determinación de diversos compuestos en gran variedad de muestras.^{411,438} Su elevada área superficial y su sencillez de preparación los han convertido en una buena opción frente a los materiales sintetizados en bloque para una gran variedad de aplicaciones. Aunque normalmente se utilizan como sorbentes para extracción en fase sólida, en este caso se decidió emplearlas como fases sensoras para la determinación de TeA.

Como se ha indicado anteriormente, en la actualidad la aproximación más utilizada para la síntesis de MIPs se basa en la impronta no covalente, debido a su sencillez y aplicabilidad a gran número de moléculas. Sin embargo, la formación de complejos de coordinación entre un ion metálico y varios ligandos, incluido el analito, permite análisis muy selectivos. Para ello es necesario seleccionar los monómeros e iones metálicos más adecuados para la formación del complejo de coordinación, como es el caso de los lantánidos y las β -dicetonas.

Los complejos de Eu con β -dicetonas se han investigado extensamente debido a su elevada eficiencia de emisión de luminiscencia.⁴³⁶ Se han descrito en bibliografía varias aplicaciones de esta combinación para el desarrollo de sensores o de indicadores, variando las propiedades y los tipos de ligandos.^{439,440} Sin embargo, su empleo en combinación con los MIPs no es habitual, aunque se han descrito algunas aplicaciones. Por ejemplo, se ha desarrollado un sensor óptico para la determinación de fluoroquinolonas basado en la formación de un complejo entre el antibiótico y los iones Eu(III). El mecanismo de detección se basa en la monitorización de la luminiscencia de la tierra rara debida a la transferencia de energía desde el estado excitado del antibiótico,

que funciona como antena, al estado excitado emisor el ion lantánido.³³³ Por otro lado, se han aplicado para la determinación de organofosfatos y pesticidas aromáticos, como el picloram.^{319,441} Si bien están descritos diversos ligandos para la formación de estos complejos luminiscentes, en el caso de la síntesis de MIPs es necesario tener en cuenta que éstos deben ser polimerizables. Además, la estabilidad del complejo debe mantenerse durante todo el proceso de polimerización.

En este trabajo llevó a cabo la síntesis de un MIP basado en la formación de complejos de Eu con β -dicetonas y TeA, selectivo a la micotoxina de interés. En esta aproximación el TeA se ha empleado como antena. La elección de los monómeros se basó en estudios previos del grupo de investigación,³¹⁹ seleccionándose para la síntesis el alilacetoacetato (AACA) y el dietilalilmalonato (DEAM), ambos con grupos β -dicetonas pero diferente estructura molecular.

8.4.1.1. Desarrollo de un método de HPLC-DAD para la determinación de TeA

A fin de determinar la concentración de TeA libre en los ensayos con el MIP y validar el sensor se modificó el método de HPLC-DAD, descrito por da Motta y col.¹³⁰, basado en la formación del complejo entre la micotoxina y los iones Zn(II).

En primer lugar, se evaluó la concentración de modificador, Zn(II), adicionada a la fase móvil necesaria para obtener la máxima sensibilidad en la determinación de TeA. Se prepararon fases móviles con acetato de zinc en fase acuosa a concentraciones 1.67, 3.32, 5.56 y 16.7 mM y se obtuvieron los calibrados en presencia de TeA en el intervalo 0 – 5 μ M, siguiendo el método descrito en el apartado 7.5.2.6. En la Figura 56 se observa que no existen diferencias significativas entre los calibrados obtenidos utilizando concentraciones de $\text{Zn}^{2+} > 3.32$ M, por lo que se seleccionó esta concentración del ion para evitar problemas de precipitación en la columna cromatográfica.

Una vez seleccionada la composición de la fase móvil se prepararon calibrados en dos medios diferentes. Por un lado se preparó un calibrado externo en ACN y, por otro lado, un calibrado en matriz utilizando extracto de arroz:ACN (3:1, *v/v*), medio en el que se optimizó la aplicación final. En ambos casos se fortificó con TeA a concentraciones entre 0 y 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y las muestras se analizaron como se describe en el apartado 7.5.2.6.

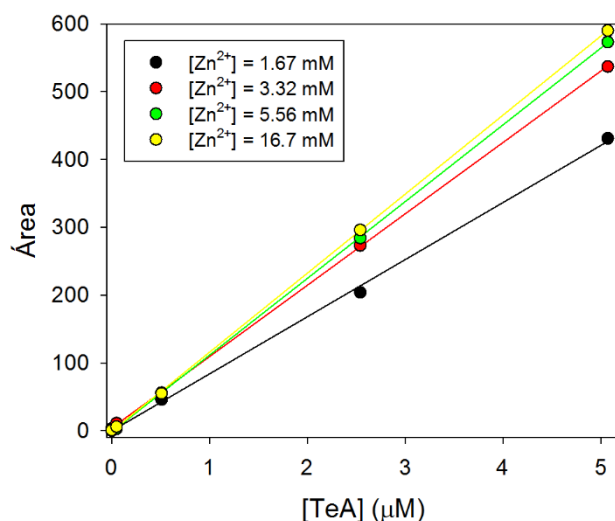


Figura 56. Evaluación del efecto de la concentración de Zn^{2+} en la fase móvil. [TeA]: 0 – 5 μM ($\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$, $\text{RSD} \leq 5\%$).

Como se puede observar en la Figura 57 existían diferencias significativas entre ambos calibrados, indicando la presencia de efecto matriz. Por esta razón se utilizó el calibrado obtenido en matriz para la validación final del método.

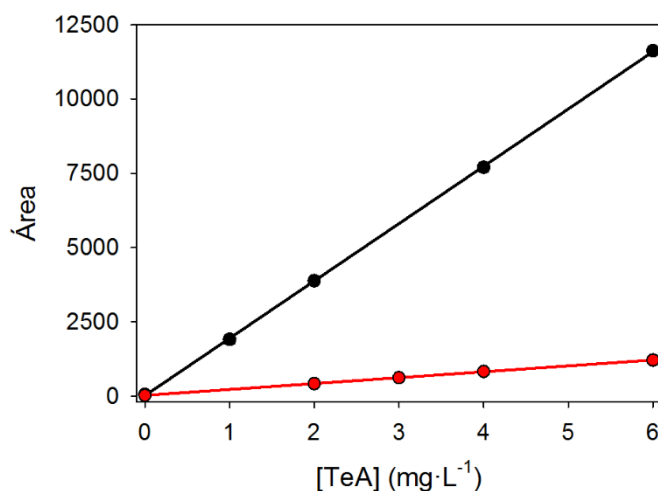


Figura 57. Curvas de calibrado obtenidas mediante HPLC-DAD para muestras preparadas en ACN (negro) y extracto de arroz diluido:ACN (3:1, v/v) (rojo). [TeA]: 0 – 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n = 3$; $\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$, $\text{RSD} \leq 5\%$).

8.4.1.2. Optimización de las condiciones instrumentales para la determinación de TeA utilizando los MIPs dopados con Eu

Como se detalla en el apartado 7.5.3.3. se seleccionaron las partículas esféricas que mejor respuesta presentaban para el reconocimiento selectivo de TeA en ACN, empleando DEAM como monómero funcional, y las condiciones de trabajo resumidas en la Tabla 16.

Tabla 16. Parámetros optimizados para el análisis de TeA empleando como fase sensora MIPs dopados con Eu. Los polímeros se depositaron sobre placas filtrantes de 96 pocillos y la señal analítica se monitorizó utilizando un lector de placas.

Parámetro	Valor
Volumen de muestra (mL)	3
Masa de polímero (mg)	2
Tiempo de incubación (h)	1
Filtro de excitación (nm)	Ex TR (337)
Filtro dicróico	LP TR
Filtro de emisión (nm)	615-18
Altura focal (mm)	3.3
Ganancia	534
Tiempo de integración (μs)	1000
Tiempo de inicio (μs)	30

La fosforescencia es una transición radiativa entre estados electrónicos de distinta multiplicidad de espín, generalmente transiciones de triplete a singlete. A nivel práctico, se puede definir como “una luminiscencia retardada que persiste una vez que cesa la fuente de excitación”. El hecho de que se trate de una transición prohibida, provoca que la emisión sea más lenta y dure más tiempo que la fluorescencia.⁴⁴² Estas características requieren que las medidas se realicen con cierto retraso respecto al pulso de excitación, lo que evita recoger la radiación dispersada sobre la muestra, y durante un intervalo de tiempo más largo, mejorando la relación señal/ruido. Por esta razón se optimizaron ambos parámetros: el tiempo de retraso respecto a la excitación y el tiempo de integración.

Para seleccionar el tiempo de retraso o *delay* más adecuado para las medidas con las fases sensoras, se midió la señal de fondo obtenida para una placa filtrante de 96 pocillos en ausencia de polímero, es decir, midiendo únicamente la señal procedente del fondo de la placa que debería ser nula. Se utilizaron las condiciones de medida descritas en la Tabla 16 así como el procedimiento detallado en el apartado 7.5.2.7., aplicando tiempos de retraso entre 0 y 40 μs. En la Figura 58, se observa que, a medida que aumenta

el tiempo de retraso, disminuye la señal del fondo hasta alcanzar un valor mínimo a 30 μs . Este valor se fijó para el resto de los experimentos.

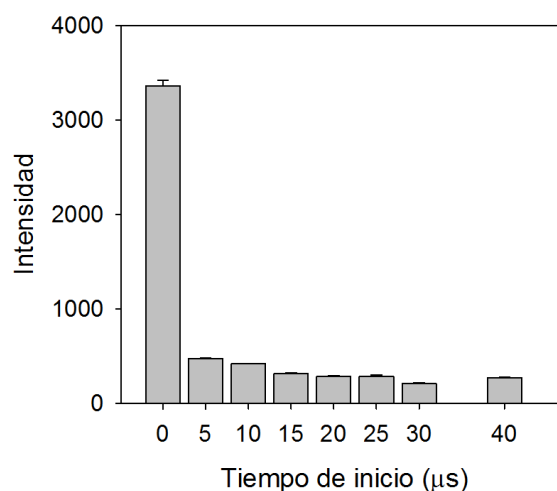


Figura 58. Intensidad de emisión medida en el lector de placas para una placa filtrante de 96 pocillos a diferentes tiempos de retraso ($n = 3$, $\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$).

En segundo lugar, se evaluó el tiempo de integración, es decir, el tiempo durante el cual se recogió la emisión del MIP tras su incubación con TeA en ACN a concentraciones entre 0 – 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se utilizaron los parámetros indicados en la Tabla 16 así como el procedimiento descrito en el apartado 7.5.2.7. y el tiempo de integración se varió entre 250, 500 y 1000 μs . En la Figura 59 se muestran los calibrados obtenidos para los diferentes tiempos de integración. Se comprueba que la pendiente del calibrado aumenta con el tiempo de integración por lo que se seleccionó un valor de 1000 μs para el desarrollo del ensayo.

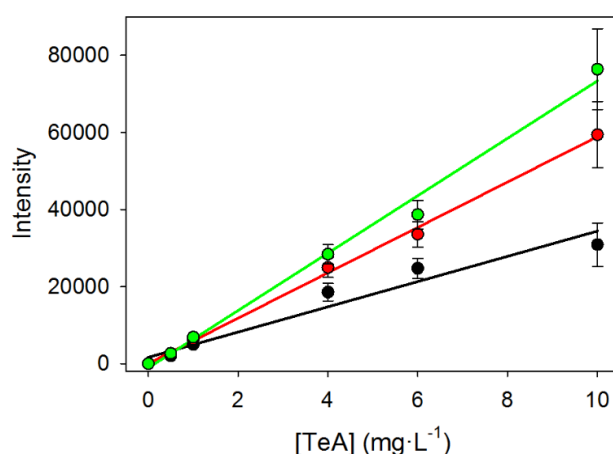


Figura 59. Curvas de calibrado obtenidas en el lector de placas utilizando los MIPs dopados con Eu en presencia de TeA en ACN utilizando tiempos de integración de 250 (negro), 500 (rojo) y 1000 μs (verde). Las condiciones de medida se detallan en la Tabla 16. [TeA]: 0 – 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n = 3$, $\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$).

8.4.1.3. Optimización de las condiciones experimentales para la determinación de TeA utilizando los MIPs dopados con Eu

En el apartado anterior se describen las condiciones de medida para la determinación de TeA utilizando los MIPs dopados con Eu (Tabla 16). Para evitar problemas de reproducibilidad en las medidas con las fases sensoras empleando las plazas filtrantes de 96 pocillos, y dado el efecto del disolvente sobre la emisión los complejos de Eu,^{443,444} se evaluó el tiempo óptimo para llevar a cabo las determinaciones tras el filtrado de las disoluciones de incubación. Para ello las fases sensoras, basadas en MIPs dopados con Eu(III), se incubaron con TeA en ACN a concentraciones entre 0 y 10 mg·L⁻¹ según el procedimiento descrito en el apartado 7.5.2.7, midiéndose su luminiscencia a diferentes tiempos tras la filtración de los polímeros en la placa. En la Figura 60 se muestra la variación de la pendiente del calibrado en función del tiempo observándose que la sensibilidad es máxima y se estabiliza a partir de 20 min. Por esta razón se seleccionó este tiempo entre el filtrado de los MIPs en la placa y la medida para el resto de los experimentos.

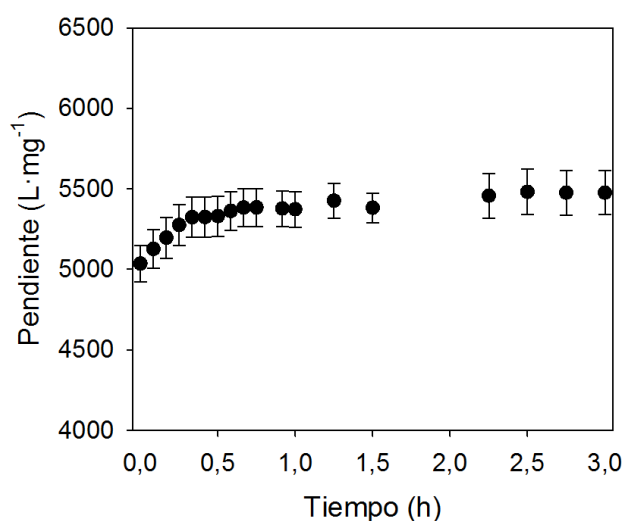


Figura 60. Evolución de la pendiente del calibrado obtenida para los MIPs dopados con Eu incubados con TeA (0 – 10 mg·L⁻¹) en ACN en función del tiempo transcurrido entre la filtración y la medida ($n = 3$, $\lambda_{\text{ex}} = 337$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 615$ nm).

8.4.1.4. Aplicación de los MIPs dopados con Eu a la determinación de Eu en muestras de alimentos

Una vez optimizados todos los parámetros y seleccionadas las condiciones de medida, las fases sensoras basadas en MIPs dopados con Eu(III) se aplicaron a la

determinación de TeA en el extracto de una muestra de arroz. Se seleccionó dicha matriz dado que el hongo *Pyricularia oryzae* o *Magnaporthe oryzae*, que puede producir TeA, está considerado como la principal *enfermedad* del arroz debido a su enorme poder destructivo.⁴⁴⁵

Una vez seleccionado el alimento se procedió a la extracción tal y como se detalla en el apartado 7.5.2.8. Debido a interferencias de la matriz fue necesario realizar una dilución del extracto ya que no se obtuvieron recuperaciones comparables a las obtenidas mediante un calibrado externo. No obstante, y tal como se detalla en el apartado 7.5.2.6, no existían diferencias significativas entre los calibrados medidos en ACN y en el extracto de la matriz (dilución 25:75, *v/v*) en el intervalo de 0.8 – 6 mg·L⁻¹. Los resultados obtenidos con el sensor se validaron empleando el método de HPLC-DAD descrito anteriormente.

La principal limitación del método desarrollado es que en algunas muestras se han encontrados concentraciones de TeA inferiores a los límites de cuantificación obtenidos con el MIP.⁸⁰ No obstante, el desarrollo de este polímero ha supuesto un gran avance ya que, hasta la fecha, es el primer MIP selectivo a TeA, así como la primera plataforma sensora desarrollada para la detección de este analito, lo cual abre un nuevo campo de investigación en esta línea.

8.4.2. Síntesis de MIPs en formato núcleo recubrimiento, SiO₂@ MIP, selectivos a TeA

El empleo de micropartículas para el desarrollo de sensores ópticos para TeA permitió demostrar la aplicabilidad de los MIPs para el análisis de muestras contaminadas con TeA. Sin embargo, la sensibilidad obtenida era inferior a la de los métodos cromatográficos y además, existían ciertas limitaciones en cuanto al tiempo de incubación y secado de las muestras. Para evitar este problema se decidió llevar a cabo la síntesis de nano-recubrimientos de MIP sobre un núcleo de gel de sílice (SiO₂) de tamaño nanométrico (SiO₂@MIP). El empleo de partículas SiO₂@MIP facilita la accesibilidad del analito al sitio de reconocimiento selectivo, con lo que la cinética de unión es más rápida. Por otra parte, al aumentar el área superficial para una misma masa de MIP debería incrementarse la capacidad de carga de la fase sensora.⁴⁴⁶

El método más utilizado para la síntesis de nanopartículas de sílice (SiO_2) es el conocido como método Stöber que permite la obtención de nanopartículas de sílice monodispersas y de tamaño controlado. El procedimiento emplea, generalmente, tetraetilortosilicato (TEOS), como precursor y la síntesis se lleva a cabo en un medio hidro-alcoholico en presencia de un catalizador básico (Figura 61).⁴⁴⁷

$$\begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{EtO} \quad \text{OEt} \\ \diagdown \quad / \\ \text{Si} \\ / \quad \diagdown \\ \text{EtO} \quad \text{OEt} \end{array} & \xrightarrow[\text{EtOH}]{\text{H}_2\text{O} / \text{NH}_3} & \begin{array}{c} \text{HO} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{Si} \\ / \quad \diagdown \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array} \\ \text{Tetraetilortosilicato} & & \text{Tetrahidróxido} \\ \text{(TEOS)} & & \text{de silicio} \end{array}$$

Noncondensation

El tamaño de las partículas obtenidas se puede modificar variando algunos parámetros de la síntesis por ejemplo, la temperatura, la relación entre el catalizador y el TEOS, la relación entre el agua y el alcohol, el tipo de alcohol utilizado o la velocidad de adición de los diferentes reactivos.^{448,449} En la Tabla 5 se muestran los parámetros estudiados en el curso de este trabajo partiendo de una modificación del método Stöber, optimizada previamente en el grupo de investigación,²⁸⁸ así como los diámetros obtenidos en cada caso a partir de las micrografías SEM empleando el software ImageJ®. Tanto las micrografías como los histogramas de distribución de tamaños se encuentran recogidos en la Figura 62. En todos los casos se utilizó amoníaco como catalizador.

Tabla 17. Composición, condiciones y diámetros de las partículas de SiO₂ sintetizadas en la presente Tesis Doctoral. El diámetro medio se calculó a partir de las micrografías SEM, con el programa ImageJ® tomando 100 partículas para la representación del histograma de distribución de tamaños.

Código	EtOH (mL)	MeOH (mL)	H ₂ O (mL)	NH ₄ OH (mL)	TEOS (mL)	T (°C)	Ø (nm)
S1	160	0	40	13,3	2	25	250 ± 30
S2	0	160	40	13,3	2	25	n.d.
S3	80	80	40	13,3	2	25	170 ± 20 250 ± 20
S4	160	0	40	6,65	1	25	100 ± 20 170 ± 10
S5	160	0	40	2,63	0,4	25	n.d.
S6	160	0	40	5,4	0,8	25	53 ± 9
S7	160	0	40	10,8	1,6	25	240 ± 30
S8	100	0	100	10,8	1,6	25	n.d.
S9	160	0	40	10,8	1,6	70	140 ± 30

n.d.: no se pudo determinar o no se obtuvieron partículas.

Utilizando la composición S1 se obtuvieron partículas, con cierta polidispersidad, con un diámetro medio de 250 nm, algo superior al tamaño buscado. No obstante, la reproducibilidad obtenida en la síntesis de estos materiales era excelente ($RSD \leq 10\%$) y se separaban fácilmente del medio de síntesis por centrifugación, con rendimientos cercanos al 99%. Es por ello que se decidió emplear esta composición como punto de partida y realizar algunas variaciones para evaluar su efecto sobre el tamaño final de las partículas.

En una primera aproximación se investigó el efecto del tipo de alcohol empleado en la síntesis, ya que se ha descrito en la bibliografía que la variación de la cadena hidrocarbonada de los alcoholes puede afectar al tamaño de las partículas obtenidas. El empleo de alcoholes de cadena corta, como el MeOH, genera un mayor número de nanopartículas debido a que disminuye el efecto estérico favoreciendo el incremento de la velocidad de hidrólisis.

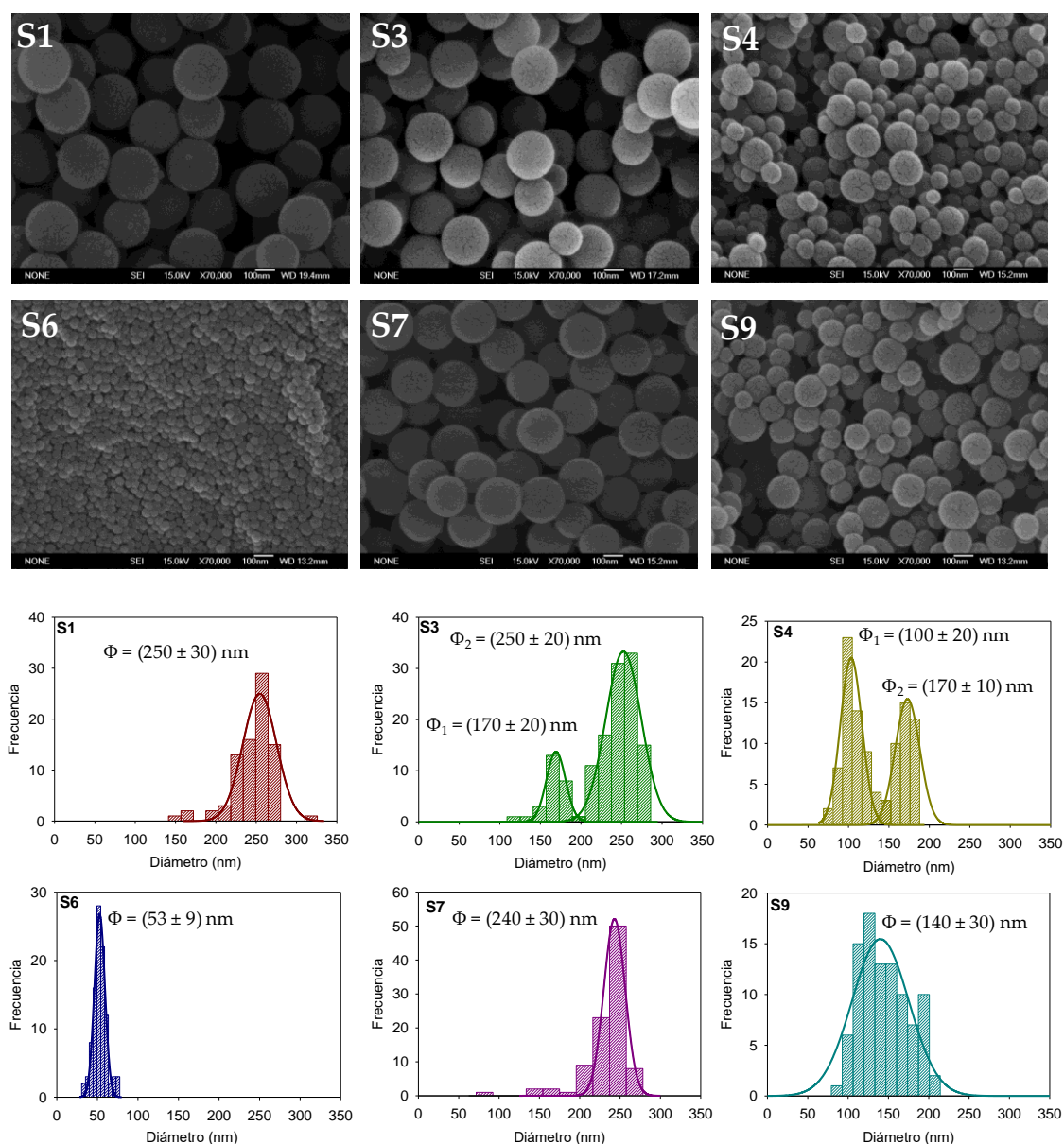


Figura 62. Micrografías SEM (arriba) e histogramas de distribución de tamaños (abajo) de las partículas de SiO_2 sintetizadas. La distribución de tamaños se calculó utilizando el software ImageJ® y tomando 100 partículas por muestra. Los códigos se encuentran recogidos en la Tabla 17.

En principio, el empleo de mezclas de EtOH y MeOH permite controlar el tamaño de las partículas, dado que el primero favorece la condensación y el segundo la hidrólisis, habiéndose descrito en la bibliografía que el tamaño de las nanopartículas disminuye a medida que se aumenta la proporción de MeOH en la mezcla.⁴⁵⁰ Partiendo de esta base se sintetizaron las nanopartículas con las composiciones S2 y S3. En el primer caso no se obtuvieron nanopartículas. Para la composición S3 sí se obtuvieron partículas con dos poblaciones diferenciadas de 170 y 250 nm, la primera con un tamaño inferior a las partículas obtenidas anteriormente, presumiblemente debido a la presencia

del MeOH, y las segundas con un tamaño equivalente. Finalmente, se descartó esta ruta de síntesis debido a la dificultad de trabajar con dos poblaciones diferentes.

Una vez descartado el uso de otros alcoholes se decidió modificar otros parámetros como la cantidad de TEOS y amoníaco en la mezcla de síntesis o la temperatura. Todos estos factores influyen en el tamaño de las partículas dado que afectan a las etapas de hidrólisis y condensación.⁴⁴⁸ El aumento en la cantidad de TEOS conduce a un aumento del tamaño de las partículas al aumentar la cantidad de Si en el medio, aunque siempre hay que tener en cuenta la proporción con el resto de componentes. La hidrólisis es un proceso generalmente lento que requiere el uso de catalizadores ácidos o básicos, como es el caso del amoníaco, que cataliza tanto el proceso de hidrólisis como el de condensación. Es por ello que una reducción de la concentración de base provoca una disminución del tamaño de las partículas. Por estas razones se decidió disminuir la cantidad de ambos respecto a las proporciones de S1, en 1/2 (S4), 1/5 (S5), 1/2.5 (S6) y 1/1.25 (S7), manteniendo constante la relación $\text{NH}_4\text{OH}/\text{TEOS}$ (6.7, *v/v*), a fin de confirmar si a medida que disminuye la cantidad de ambos en la mezcla de síntesis, también lo hace el tamaño de las partículas. En todos los casos se obtuvieron partículas, excepto para S5 donde posiblemente la cantidad de TEOS era tan pequeña que no se superó el punto de nucleación y no se formó el SiO_2 . Se comprobó que la disminución de la concentración de los reactivos (NH_4OH y TEOS) originaba la formación de partículas de menor tamaño. Para el caso de S7, la composición con la menor variación respecto a la original, se obtuvieron partículas de tamaño similar a S1, pero menor polidispersidad. Las partículas S4 presentaron un tamaño inferior, pero se obtuvieron dos poblaciones diferenciadas, de 100 y 170 nm, lo que las hacía poco útiles para el fin deseado. Finalmente, las partículas S6 presentaron un diámetro medio de 53 nm, con un bajo índice de polidispersidad, por lo que resultaban muy adecuadas para la síntesis de las partículas núcleo-recubrimiento.

Otro factor considerado fue la proporción de agua y EtOH de la mezcla de síntesis, ya que la primera afecta a la hidrólisis y a la nucleación, y la relación de ambas afecta a la competición entre los procesos de nucleación y crecimiento. Un aumento de la cantidad de agua, que lleve asociado una disminución en la cantidad de alcohol, produce una disminución en el tamaño de las nanopartículas.⁴⁵¹ De esta manera se

redujo la proporción agua/EtOH un cuarto con respecto a S1, aunque en este caso no se obtuvieron nanopartículas, o fueron tan pequeñas que no se lograron recuperar, por lo que se decidió descartar esta vía de síntesis.

El último factor a tener en cuenta fue la temperatura de reacción, la cual tiene un efecto en la saturación de la concentración de amoníaco en la disolución. El aumento de temperatura se traduce en una disminución en el tamaño de las partículas por lo que, tomando como base las condiciones de reacción empleadas en S7, se decidió aumentar la temperatura a 70 °C. Se empleó un reactor cerrado para evitar la evaporación del amoníaco. En estas condiciones, se obtuvieron partículas con un tamaño promedio de 140 nm, pero con una gran polidispersidad, que también se descartaron para estudios posteriores.

Según estos resultados, las partículas seleccionadas inicialmente para la síntesis de las partículas núcleo-recubrimiento fueron las S6. Sin embargo, la masa de partículas obtenida, proporcional a la cantidad de TEOS utilizada, era muy baja, lo que hacía necesaria la preparación de varios lotes para obtener la cantidad suficiente. Además, durante la centrifugación se comprobó que las partículas agregaban con gran facilidad, lo que dificultaba su uso. Este hecho podría justificarse considerando la formación de un ópalo, en el cual las nanopartículas se agregan disminuyendo la energía libre del sistema derivada de la gran área superficial que presentan.⁴⁵²

Por estas razones se seleccionaron las partículas S7 como las idóneas para continuar con el desarrollo del sensor. Además, se comprobó la posibilidad de escalar hasta cuatro veces las cantidades utilizadas, obteniendo una gran masa de partículas sin que se observaran variaciones en el tamaño, o en el índice de polidispersidad, de las mismas, demostrándose a su vez la robustez en términos de síntesis y composición.

8.4.2.2. Funcionalización de las partículas de SiO₂ con una agente RAFT

La síntesis del recubrimiento MIP, empleando las partículas sílice como núcleo, se llevó a cabo empleando un proceso de polimerización mediante transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT, del inglés *reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization*). Se trata de una polimerización controlada utilizando los denominados agentes RAFT, generalmente ditioésteres o

ditio/tritiocarbamatos,⁴⁵³ que facilitan la adición de monómeros en la cadena polimérica de manera sencilla y repetitiva hasta que no quedan unidades disponibles en el medio.⁴⁵⁴

Una ventaja de esta aproximación es que al final de la reacción todas las cadenas poliméricas formadas presentan el mismo, o muy similar, peso molecular, lo que se traduce en la obtención de partículas prácticamente monodispersas. Se trata de una técnica muy utilizada para la síntesis de MIPs.³⁵⁹

Antes de la polimerización el agente RAFT se inmovilizó sobre la superficie de las partículas de SiO₂. Este proceso constó de tres etapas: 1) activación de la superficie de las partículas; 2) silanización con 4-(clorometil)feniltriclorosilano (4-CPC), y 3) funcionalización con bromuro ditiobenzoato de magnesio. Se siguió el protocolo descrito por Carrasco y col.²⁸⁸ con ligeras modificaciones, tal y como se describe a continuación (Figura 63).

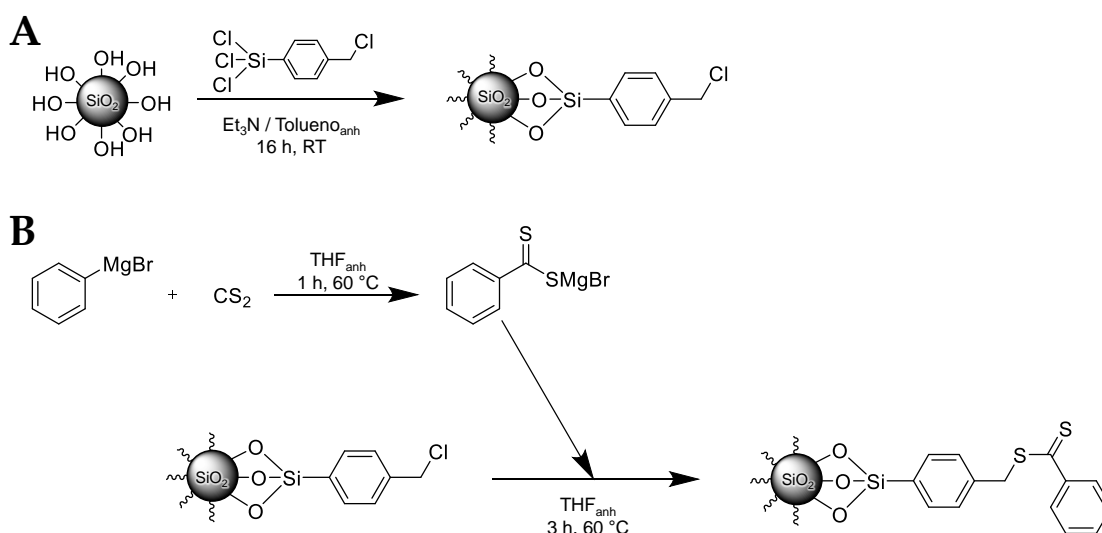


Figura 63. Esquema de reacción: (A) silanización de las nanopartículas de SiO₂ con 4-CPC y, (B) síntesis e inmovilización del bromuro ditiobenzoato de magnesio.

1) Rehidroxilación de las nanopartículas de SiO₂

Las partículas de SiO₂ se suspendieron en 30 mL de agua con 7.5 mL de HCl y la mezcla se mantuvo a reflujo durante 5 h. A continuación, las partículas se lavaron con agua (40 mL x 3) y MeOH (40 mL x 3). Finalmente, se resuspendieron en tolueno anhidro para el siguiente paso.

2) *Silanización de las nanopartículas con 4-CPC*

Se añadieron 2 g de nanopartículas sobre 40 mL de tolueno anhidro en un matraz de 100 mL y la mezcla se purgó con Ar durante 10 min. Seguidamente se adicionaron sobre la suspensión 3 mL de 4-CPC, gota a gota, y 1.86 mL de trietilamina diluidos en 10 mL de tolueno anhidro. La reacción se mantuvo 16 h a reflujo en atmósfera inerte. A continuación, se centrifugaron las partículas a 11.000 rpm y se lavaron con tolueno (40 mL x 3), MeOH (40 mL x 3) y THF (40 mL x 2) para finalmente dejarlas suspendidas en 40 mL de THF anhidro.

3) *Síntesis e inmovilización del bromuro ditiobenzoato de magnesio*

La síntesis e inmovilización del agente RAFT se realizó *one-pot*. En un matraz de 250 mL, conectado a un refrigerante, que contenía 40 mL de THF anhidro, en atmósfera inerte, se añadieron 30 mL de bromuro de fenilmagnesio (1 M en THF) y 4.6 mL de CS₂, gota a gota, tras lo cual se dejó reaccionar a 50 °C durante 1 h. Posteriormente, se añadió la suspensión de nanopartículas silanizadas manteniéndose a 50 °C durante 3 h. Por último, las partículas se centrifugaron a 11.000 rpm y se lavaron con THF (40 mL x 3) y ACN (40 mL x 3) para dejarlas suspendidas en 50 mL de ACN.

La presencia de azufre en la superficie se confirmó mediante microanálisis elemental y a partir del incremento del porcentaje de carbono se calculó el porcentaje de funcionalización respecto al silano, siendo de un 70%. Asimismo, se observó mediante SEM que las partículas conservaban su morfología y tamaño tras las etapas de funcionalización.

8.4.2.3. Síntesis de las partículas núcleo recubrimiento SiO₂@MIP

La síntesis de los polímeros sobre los núcleos de sílice se realizó utilizando la composición optimizada en la síntesis de las micropartículas porosas (apartado 7.5.3.3). Para ello se preparó una mezcla de prepolimerización, de acuerdo con trabajos existentes sobre este tipo de materiales,^{288,312} que contenía 94 nmol de DEAM, 31 nmol de EuCl₃, 94 nmol de NaOH y 469 nmol de EDMA en 10 mL de EtOH. A continuación, se añadió el iniciador ABDV (1% *p/p* respecto a los monómeros) y 10 mL de una suspensión de nanopartículas SiO₂@RAFT de diferentes concentraciones. Para determinar la

proporción más adecuada, se mantuvo constante la mezcla de prepolimerización variando la masa de nanopartículas presentes en la suspensión (7.2, 36, 90 y 180 mg). Finalmente, y tras purgar con N_2 , la mezcla se mantuvo 1 h a 60 °C y 15 min a 70 °C. Las partículas se lavaron por centrifugación con EtOH y, finalmente, se resuspendieron en 6 mL de ACN. Cabe resaltar que en este experimento no se añadió la molécula plantilla, TeA, puesto que la optimización de la síntesis del polímero se llevó a cabo con el NIP.

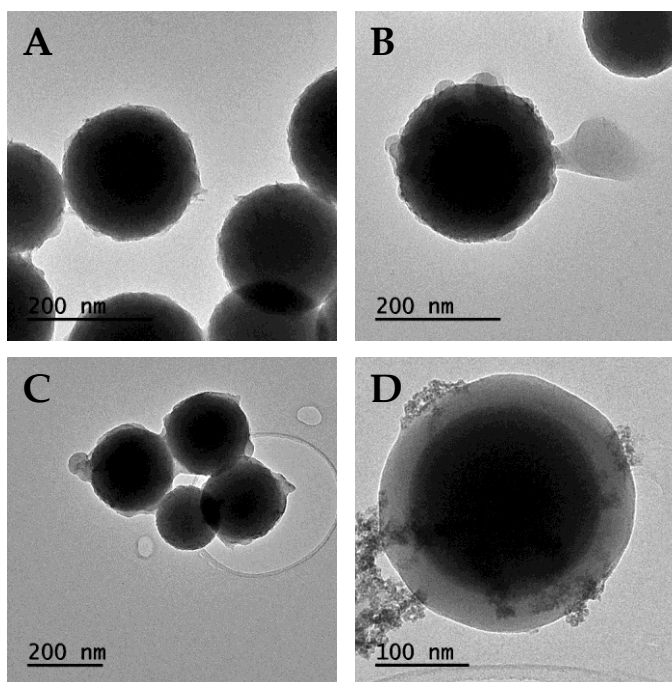


Figura 64. Micrografías de TEM de las partículas $SiO_2@NIP$ sintetizadas utilizando (A) 180, (B) 90, (C) 36 y (D) 7.2 mg de $SiO_2@RAFT$.

Las micrografías TEM (Figura 64) muestran las diferencias morfológicas encontradas para las diferentes partículas sintetizadas variando la masa de nanopartículas para una misma masa de prepolimerización. El recubrimiento polimérico tan solo es homogéneo cuando se emplean 7.2 mg de partículas funcionalizadas (Figura 64D). Cualitativamente, a partir de los datos de las micrografías, se puede concluir que la capa de polímero tiene un espesor de, aproximadamente, 40 nm. Asimismo, se confirmó la presencia de polímero mediante FTIR ya que se observaba la aparición de una banda en torno a 1730 cm^{-1} , correspondiente a la vibración asimétrica de los grupos carbonilo del mismo. Otro hecho relevante es la desaparición de las bandas de vibración correspondientes a los hidroxilos, en torno a 3500 cm^{-1} tras la funcionalización (Figura 65).

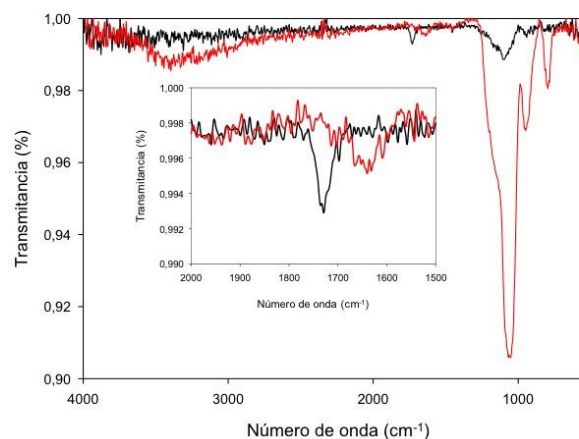


Figura 65. Espectro FTIR y ampliación (interior) de las partículas SiO₂@NIP sintetizadas utilizando 7.2 mg de SiO₂@RAFT (negro). En rojo se representa el espectro correspondiente a las partículas SiO₂@RAFT de partida.

Para evitar la coalescencia de las partículas generadas, se decidió incrementar el volumen de disolvente, manteniendo constante el resto de los parámetros. En la Figura 66 se muestran las micrografías TEM y los espectros de FTIR de los MIPs sintetizados añadiendo 31 nmol de TeA a la mezcla de prepolimerización, y llevando ésta a un volumen final de 20 (8B) y 25 mL (8C) con EtOH.

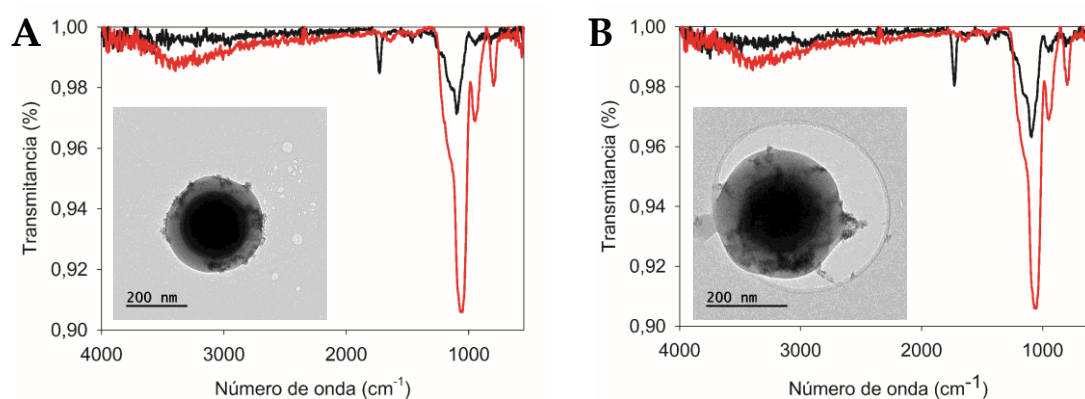


Figura 66. Espectros FTIR y micrografías TEM de las partículas SiO₂@MIP (A) 8B y (B) 8C (negro). En rojo se representa el espectro de las partículas SiO₂@RAFT de partida.

En ambos casos se pudo observar la aparición de la banda ν_{as} (C=O) a 1730 cm⁻¹ y, con menor intensidad, la banda de δ (CH₂/CH₃) a 1455 cm⁻¹ que confirma la presencia de una matriz polimérica en las partículas. En las micrografías TEM se observa que el recubrimiento obtenido es diferente, siendo mayor en el caso de 8C con un espesor de unos 70 nm.

Confirmada la formación del recubrimiento polimérico para ambas composiciones, se procedió a la síntesis de los NIPs, con el nuevo volumen de porógeno (NIP C). Se observó que, en estas condiciones no se obtenía el recubrimiento polimérico sobre la superficie de la sílice en ausencia de la plantilla (Figura 68B). Dado que la presencia o ausencia de la plantilla en la mezcla de prepolimerización puede afectar a la formación del polímero y a sus características estructurales,⁴⁵⁵ se decidió sintetizar un polímero control o CIP (del inglés, *control imprinted polymer*) empleando malonato de dimetilo como plantilla.²⁸⁸ Este compuesto también se coordina con el Eu(III) y presenta un tamaño ligeramente inferior al TeA, lo que evitaría la entrada de moléculas de mayor tamaño a los sitios de unión generados. En la Figura 67 se puede ver la estructura de las moléculas utilizadas como plantillas y un esquema de los sitios de unión del MIP, NIP y CIP.

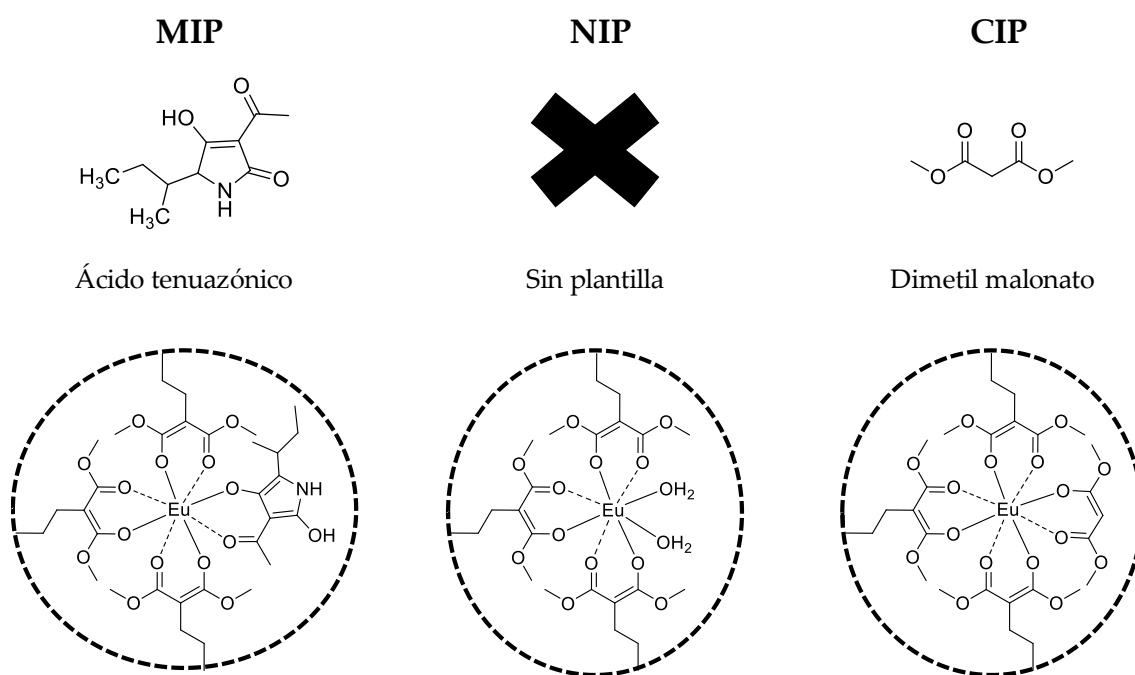


Figura 67. Arriba, estructura de las plantillas utilizadas para la síntesis de los MIPs, NIPs y CIPs. Abajo, esquema de la posible distribución de las moléculas en los sitios de unión de los polímeros en los casos mencionados anteriormente.

Los CIP@SiO₂, polímeros 8B y 8C, se caracterizaron mediante TEM (Figura 68A) y FTIR. Los espectros de infrarrojo mostraron las bandas correspondientes a la formación de la capa de polímero. En las micrografías TEM se observaron las partículas núcleo-recubrimiento correspondientes a los CIPs sintetizados. En el caso del polímero CIP 8B, sintetizado en presencia de 20 mL de EtOH, se comprobó que el recubrimiento

era comparable al obtenido para el MIP@SiO₂ o el NIP@SiO₂ con un grosor aproximado entre 40 y 50 nm (Figura 68A). En el caso del polímero 8C los CIP@SiO₂, presentaban una mayor heterogeneidad en los recubrimientos, que no eran comparables con los obtenidos para el MIP@SiO₂, teniendo un grosor aproximado de 35 nm (Figura 68B). Este hecho corroboró la importancia del porógeno y de la plantilla en la polimerización, en lo que respecta al control de la morfología y el grosor de los recubrimientos sintetizados.

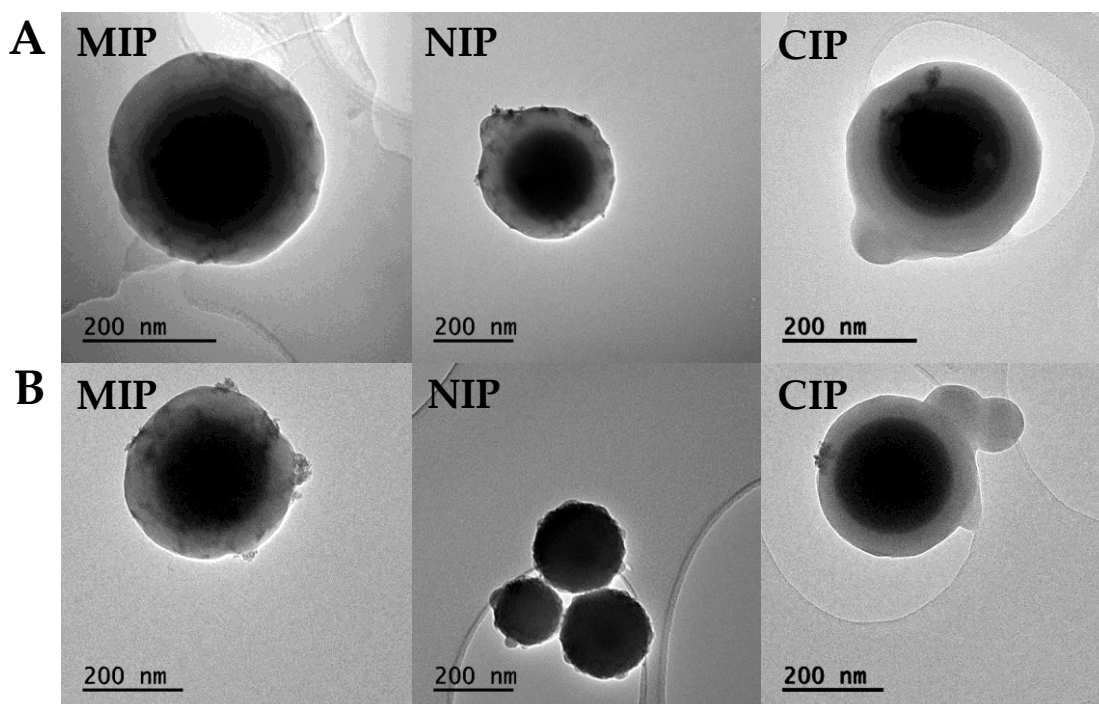


Figura 68. Micrografías TEM de las partículas SiO₂@MIP/NIP/CIP: (A) 8B y (B) 8C.

8.4.2.4. Evaluación del reconocimiento de las partículas SiO₂@MIP/NIP/CIP

Una vez sintetizados los polímeros se procedió a la evaluación del reconocimiento selectivo frente al TeA. Para ello, en una primera etapa se optimizó un método para la eliminación de la plantilla y la reincorporación del Eu(III) a los sitios de unión. En este caso no fue posible utilizar el protocolo descrito previamente (apartado 7.5.2.5.), ya que medios extremadamente ácidos o básicos pueden disolver la sílice,⁴⁵⁶ produciendo deformaciones en las partículas y llegando a hacer que pierdan su funcionalidad.

Por esta razón, se empleó una mezcla de EtOH:HAc (2%, *v/v*) para favorecer la protonación de los monómeros funcionales, y la liberación del TeA, sin afectar a la

integridad el SiO_2 .²⁸⁸ A continuación, se realizó una incubación con EuCl_3 en medio básico durante 15 min, comprobando que la estructura de las partículas no se alteraba en esas condiciones.

Para el ensayo de reconocimiento se incubó 1 mg de partículas con 1 mL de TeA de concentración $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en ACN durante 1 h. A continuación, se eliminó el sobrenadante por centrifugación y las partículas se resuspendieron en el mismo volumen de ACN para medir su emisión en un lector de placas, depositando $100 \mu\text{L}$ de la suspensión en una placa negra de 96 pocillos. Las condiciones de medida fueron las descritas en el apartado 7.5.2.7, aunque en ocasiones se ajustó según las necesidades de la optimización. En este primer ensayo se observó que tras el lavado con EtOH:HAc (2%, *v/v*) disminuía la señal luminiscente, que aumentaba ligeramente al añadir el Eu(III) y, finalmente, aumentaba con la incorporación del TeA (Figura 69A). Sin embargo, la reproducibilidad de los ensayos era baja en todos los casos, aunque la señal siempre aumentaba significativamente en presencia del analito (Figura 69B).

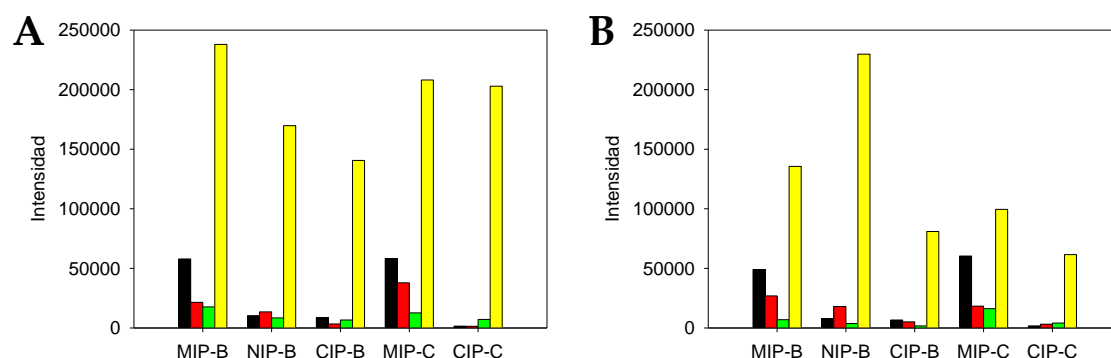


Figura 69. Respuesta analítica obtenida para las partículas de SiO_2 @MIP/NIP/CIP 8B y 8C tras la síntesis (negro), tras el lavado con EtOH:HAc (2%, *v/v*) (rojo), incubadas con EuCl_3 en medio básico (verde) e incubadas con TeA ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en ACN) en dos ensayos diferentes, A y B (amarillo). (Altura focal 4.8 mm; ganancia 1597).

En principio, la señal de luminiscencia medida tras la síntesis del polímero debería ser máxima, ya que todos los sitios de unión deben estar ocupados por el analito. Sin embargo, hay que tener en cuenta que antes de la medida inicial, los polímeros se lavaron con EtOH y ACN para eliminar los restos de la mezcla de prepolimerización, lo que podría eliminar parte del TeA que no estuviera unido fuertemente al Eu(III). Por otra parte, en este ensayo preliminar no se había incluido una etapa de lavado, tras la incubación con TeA, para eliminar la micotoxina retenida por uniones no específicas.

Para evitar este problema las partículas se lavaron con ACN y con MeOH, este último en diversas cantidades ya que el primero demostró no tener ningún efecto sobre las señales obtenidas. En la Figura 70 se puede comprobar como, a medida que se añade MeOH, la señal disminuye en todos los casos, siendo mayor la disminución al incrementar la cantidad de disolvente. Este hecho hace pensar que no existe una interacción fuerte entre el TeA y los sitios de unión específica, por lo que a medida que se realizan lavados se elimina el analito que interacciona débilmente con el polímero.

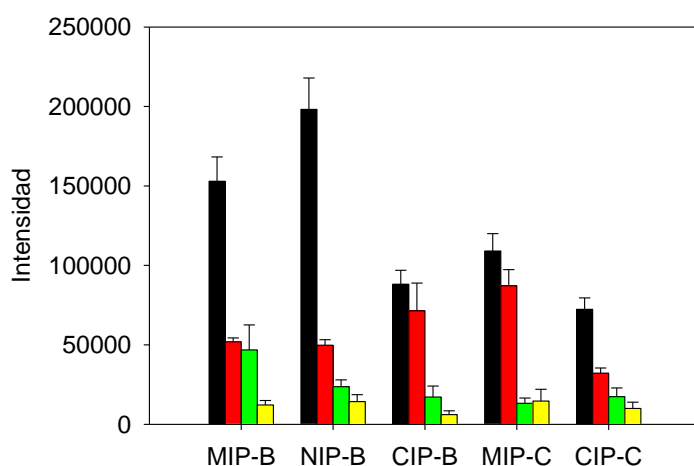


Figura 70. Estudio de lavado de las partículas $\text{SiO}_2\text{@MIP/NIP/CIP}$ 8B y 8C tras su incubación con TeA ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en ACN) y lavado con 0 mL (negro), 1 mL (rojo), 2 mL (verde) y 3mL (amarillo) de MeOH. (Altura focal 4.8 mm; ganancia 1400; $n = 3$).

Como resultado de este estudio se puede concluir que hay varios factores que pueden afectar a la respuesta de las nanopartículas frente al TeA, concretamente:

- Baja incorporación del Eu(III) a los sitios de unión. El hecho de que no se puedan emplear los mismos tiempos de incubación con la sal de Eu(III) en medio ácido, para evitar el daño a las partículas de SiO_2 , puede afectar a la señal analítica. Por ello, como futuro trabajo se ha planteado optimizar el tiempo y la temperatura de incubación para tratar de mejorar la cinética y la eficacia de unión. Asimismo, es necesario evaluar la incorporación del metal a los centros de unión mediante técnicas analíticas como fluorescencia de rayos X.
- Bajo número total de sitios de unión en el polímero dado que el recubrimiento generado tiene un espesor de pocos nanómetros. En cualquier caso, esto no debería de afectar a la reproducibilidad de la respuesta, solo al intervalo dinámico.

- Condiciones de incubación inadecuadas: las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en la incubación de los polímeros con TeA no fueron optimizadas y se basaron en las utilizadas para las microesferas porosas. La diferente morfología entre ambos materiales requiere una nueva optimización de estos parámetros que no se pudo abordar en este trabajo de tesis por falta de tiempo.

Por todas estas razones se concluye que es necesario continuar trabajando en el desarrollo y aplicación de estas partículas núcleo-recubrimiento para la determinación de TeA.

CONCLUSIONS

Molecularly imprinted hydrogels as functional active packaging materials

1. 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HFA) was successfully synthesized as a FA surrogate for the preparation of MIPs and chemically characterized.
2. A library of MIHs was synthesized using HFA, as template molecule, ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) as a cross-linker, 1-allylpiperazine (1-ALPP) or 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) as functional monomers, and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as a diluent monomer, at different molar concentrations.
3. Swelling experiments suggested that MIHs have a Fickian behavior, where water molecules easily penetrate into the free pores, even though the diameter of the MIHs capillaries are not much larger than water molecules, a characteristic commonly found in P(HEMA)-based hydrogels.
4. DMAEMA/HEMA-based MIHs with a stoichiometry of 2:4 (T:FM) showed the greatest FA loading capacity when incubated in water.
5. 1-ALLP/HEMA-based polymers, with a stoichiometry of 1:2 (T:FM), exhibited the highest imprinting factor ($IF > 2.8$) for FA in water.
6. The number of binding sites, affinity constants and heterogeneity were estimated by Freundlich isotherm-affinity distribution analysis. The number of binding sites with higher association constants were higher for P(DMAEMA-*co*-HEMA-*co*-EDMA) than for P(1-ALLP-*co*-HEMA-*co*-EDMA) MIHs.
7. Bacterial growth was not observed below the polymer (MIH/NIH) discs placed in direct contact with bacterial culture surfaces. This finding was attributed both to the antioxidant behavior of the released FA and to a decrease in the oxygen concentration below the discs, which inhibits the growth of common food microbial contaminants.
8. The effectiveness of MIH loaded with AF as antioxidant packaging materials in butter was demonstrated as oxidation was reduced by 25% after four weeks of can storage, compared to the NIHs, loaded with AF and by up to 50% compared to unprotected samples. This is one of the few applications on MIPs in this field reported in the literature.

Furfural determination with disposable polymer films and smartphone-based colorimetry for beer freshness assessment

1. Disposable color-changing polymeric films for quantification of furfural, a beer freshness maker have been reported for the first time in the literature and applied to the determination of beer aging using a smartphone-based reader.
2. A library of sensing films was synthesized by free radical copolymerization. The optimized polymer composition consists of 4-vinylaniline (VA), as furfural-sensitive indicator monomer, 2-hydroxymethylmethacrylate (HEMA) as diluent monomer and ethylene glycol dimethylmethacrylate (EDMA) as cross-linker.
3. Several parameters influencing sensor performance namely, the concentration of acid catalyst ($29 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of HCl), polymer disk thickness (0.5 mm) and incubation time (1 h), were evaluated to achieve optimum sensor performance and highest sensitivity to furfural.
4. Sensor response was monitored using a portable fiber-optic spectrophotometer. Absorption wavelength was set at 537 nm. The optimized method provided a LOD of $12 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, a linear response range between $39 - 500 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, and it allowed the analysis of furfural in water-ethanol mixtures, with an alcohol content commonly found in Spanish pale lager beers (94.6:5.4, *v/v*).
5. No cross-reactivity was observed for other volatile compounds generated during beer aging, such as 5-hydroxymethylfurfural (HMF), acetaldehyde, 2-methylpropanal, hexanal, benzaldehyde, phenylacetaldehyde and *trans*-2-nonenal, demonstrating the selectivity of the polymeric sensors for furfural analysis.
6. Repeatability and reproducibility studies demonstrated the excellent precision of the optimized sensing films, with mean recoveries ranging from 95 to 108%, and RSDs < 5%. Results have been validated by HPLC-DAD.
7. The colorimetric response, visible to the naked eye, was also monitored using the built-in camera of a smartphone. A smartphone application (app) was developed for Android® platforms to measure the RGB color coordinates of the sensing membranes after exposure to the analyte.
8. The sensing membranes were applied to the evaluation of the freshness of beers stored for more than a year, after 4-fold dilution with a water-ethanol mixture

(94.6/5.4, *v/v*), confirming the linear correlation between the storage time and furfural concentration.

Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in foodstuffs by molecularly imprinted solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

1. The composition of MIPs selective to alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME) was optimized for their application in molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE). The polymers were prepared using 4-vinylpyridine (VIPY) and methacrylamide (MAM) as functional monomers, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker and 3,8,9-trihydroxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one (S2) as AOH surrogate template.
2. The polymers were prepared in the format of porous microbeads using silica molds as sacrificial scaffolds to improve mass transfer, binding capacity and avoid the destruction of binding sites during polymer grinding.
3. MISPE loading, washing and eluting conditions were optimized to achieve selective mycotoxin extraction. In the optimized conditions the cartridges were washed with 2 mL of ACN/water (5:95, *v/v*), followed by 3 mL of ACN/water (15:85, *v/v*). Low cross reactivity was observed in the presence of other mycotoxins and structurally related compounds, except for α -zearalenol that shows non-specific retention in the MIP and the NIP due to its hydrophobic characteristics.
4. Two different S2-imprinted MIPs were compared for the analysis of AOH and AME in food matrices. The use of the P(VIPY-*co*-MAM-*co*-EDMA) polymers resulted in lower LODs and LOQs and higher loading capacities than P(EAMA-*co*-MAM-*co*-EDMA) however, the latter were more selective.
5. The combined method based on MISPE-UPLC-MS/MS was successfully validated according to the criteria set out in Commission Decision 2002/657/EC. The analytical method showed recoveries in the range of 92.5% to 106.2% and LODs and LOQs between 0.63 – 1.38 and 1.1 – 2.8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for AOH and AME, respectively, in tomato juice and sesame oil.

6. The MISPE-UPLC-MS/MS method was satisfactorily applied to the determination of AOH and AME in naturally contaminated samples of tomato juice and sesame oil. No significant differences between the MISPE-UPLC-MS/MS results and those obtained by commonly applied techniques were observed.

Rapid determination of *Alternaria* mycotoxins in tomato samples by pressurised liquid extraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection

1. A simple, fast and efficient method based on pressurized liquid extraction (PLE) was optimized, for the first time, for the extraction of two *Alternaria* mycotoxins, alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME), in tomato samples.
2. The extracted samples were analyzed by HPLC with fluorescence detection after clean-up and preconcentration of the mycotoxins by molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE). The highest extraction recoveries (97%, RSD < 4% for AOH and 90%, RSD < 3% for AME) were achieved using MeOH/water (25:75, *v/v*) at 70 °C as extraction solvent, 60 % flush volume, 5 min of static time, a pressure of 1000 psi and a single extraction cycle.
3. The application of the PLE enabled comparable recoveries to other widely applied methods with a significant reduction of extraction time, solvent consumption and sample handling.
4. The PLE-MISPE-HPLC-FLD method was validated in accordance with the European Commission Decision 2002/657/EC for the analysis of both mycotoxins in tomato samples. The LODs of the analytical method were found to be 7 and 15 µg·kg⁻¹ for AOH and AME, respectively.
5. The method was successfully applied to the determination of AOH and AME in a tomato sample naturally infected with black molds and the results were confirmed by UPLC-MS/MS.

Molecularly imprinted polymer-based sensor containing europium (III) ions for tenuazonic acid determination in food samples.

1. MIPs doped with an Eu(III) complex and aqua-labile ligands, have been synthesized that upon coordination to tenuazonic acid (TeA), yield an increase in Eu(III) typical

luminescence at 615 nm. TeA shows a maximum absorption at 284 nm when complexed to Eu(III), and is used as an antenna ligand for Eu(III) luminescence sensitization. This luminescence increase has been applied for the first time in the literature to the detection of target mycotoxin in organic solvent.

2. A library of Eu(III)-doped MIPs was synthesized, by free radical copolymerization, using two different functional monomers, namely diethyl allylmalonate (DEAM) and allyl acetoacetate (AACA) at different molar ratios and EDMA as the cross-linker.
3. With the optimized TeA:Eu(III):DEAM/AACA (mol ratio: 1:1:3) composition, microspherical porous MIPs were synthesized using silica beads as sacrificial scaffold. DEAM based MIPs showed a wider dynamic range (2.6 – 20 mg·L⁻¹) than the AACA ones, with a LOD of 0.8 mg·L⁻¹, in ACN after 1 h incubation. No signal was observed with the NIP microparticles.
4. Cross-reactivity was evaluated by incubating the MIP with other mycotoxins present in foodstuffs. Negligible luminescence was observed after incubation with alternariol and β -zearalenol. Only a small increment in the luminescence was detected in the presence of cyclopiazonic acid, that contains a β -diketone moiety in its structure, but below the LOD for TeA.
5. Eu(III)-doped MIPs allowed the analysis of TeA in rice extracts fortified with the mycotoxin, after 1:3 dilution with ACN, confirming the applicability of the luminescent MIPs to the analysis of TeA in foodstuffs.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Official Journal of the European Union* 2002, Regulation (EC) N° 178/2002, 31/1-31/24.
2. Directorate-General for Communication (European Commission), *Food safety. From farm to fork : safe and healthy food for everyone*, 2005.
3. R. Chauhan, J. Singh, T. Sachdev, T. Basu, B. D. Malhotra, *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **81**, 532-545.
4. J. W. Bennett, *Mycopathologia*, 1987, **100**, 3-5.
5. A. Ismaiel, J. Papenbrock, *Agriculture*, 2015, **5**, 492-537.
6. E. M. Fox, B. J. Howlett, *Current Opinion in Microbiology*, 2008, **11**, 481-487.
7. J. W. Bennett, M. Klich, *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, **16**, 497-516.
8. F. D. C. O. Freire, M. E. B. da Rocha, in *Fungal Metabolites*, eds. J.-M. Mérillon and K. G. Ramawat, Springer, Cham, 2016, pp. 1-23.
9. J. M. Soriano del Castillo, *Micotoxinas en alimentos*, Díaz de Santos, Madrid, 2007.
10. H. S. Hussein, J. M. Brasel, *Toxicology*, 2001, **167**, 101-134.
11. M. E. Zain, *Journal of Saudi Chemical Society*, 2011, **15**, 129-144.
12. L. B. Bullerman, A. Bianchini, *International Journal of Food Microbiology*, 2007, **119**, 140-146.
13. R. A. Stein, A. E. Bulboacă, in *Foodborne Diseases*, eds. C. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. Cliver and H. Riemann, Academic Press, 2017, ch. 21, pp. 407-446.
14. M.-C. Smith, S. Madec, E. Coton, N. Hymery, *Toxins*, 2016, **8**, 94.
15. L. Anfossi, C. Giovannoli, C. Baggiani, *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, **37**, 120-126.
16. EFSA, *EFSA Journal*, 2012, **10**, 2798.
17. P. W. J. van Dongen, A. N. J. A. de Groot, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 1995, **60**, 109-116.
18. P. Kumar, D. K. Mahato, M. Kamle, T. K. Mohanta, S. G. Kang, *Frontiers in Microbiology*, 2016, **7**, 2170.
19. A. V. Sartori, J. Swensson de Mattos, M. H. P. de Moraes, A. W. da Nóbrega, *Food Analytical Methods*, 2015, **8**, 2321-2330.
20. K. Neme, A. Mohammed, *Food Control*, 2017, **78**, 412-425.

21. U. P. Sarma, P. J. Bhetaria, P. Devi, A. Varma, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2017, **32**, 124-133.
22. S. S. Deshpande, in *Handbook of Food Toxicology*, ed. M. Dekker, CRC Press, 2002, ch. 11.
23. M. Magro, D. E. Moritz, E. Bonaiuto, D. Baratella, M. Terzo, P. Jakubec, O. Malina, K. Čépe, G. M. F. d. Aragao, R. Zboril, F. Vianello, *Food Chemistry*, 2016, **203**, 505-512.
24. I. Bovdisova, K. Zbynovska, A. Kalafova, M. Capcarova, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2016, **05**, 10-13.
25. A. B. Trivedi, M. Hirota, E. Doi, N. Kitabatake, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1993, **0**, 2167-2171.
26. B. R. Clark, R. J. Capon, E. Lacey, S. Tennant, J. H. Gill, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2006, **4**, 1520-1528.
27. P. López Sánchez, M. de Nijsa, M. Spanjerb, A. Pietric, T. Bertuzzic, A. Starski, J. Postupolski, M. Castellari, M. Hortós, *EFSA Supporting Publications*, 2017, **14**, 1177E.
28. G. A. Sansing, E. B. Lillehoj, R. W. Detroy, M. A. Miller, *Toxicon*, 1976, **14**, 213-220.
29. I. Lhotská, D. Šatínský, L. Havlíková, P. Solich, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 3319-3329.
30. V. Ostry, F. Malir, J. Ruprich, *Toxins*, 2013, **5**, 1574-1586.
31. P. M. Scott, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2012, **29**, 242-248.
32. T. A. Becker-Algeri, D. Castagnaro, K. de Bortoli, C. de Souza, D. A. Drunkler, E. Badiale-Furlong, *Journal of Food Science*, 2016, **81**, R544-R552.
33. C. Y. Chan, B. J. Kelman, in *Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology*, John Wiley & Sons Inc., 2015, pp. 1283-1294.
34. T. R. Bui-Klimke, F. Wu, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, **55**, 1860-1869.
35. S. Marin, A. J. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis, *Food and Chemical Toxicology*, 2013, **60**, 218-237.
36. X. Li, H. Li, X. Li, Q. Zhang, *Food Chemistry*, 2017, **233**, 290-301.
37. K. De Ruyck, M. De Boevre, I. Huybrechts, S. De Saeger, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2015, **766**, 32-41.

38. M. Á. Pavón Moreno, I. González Alonso, R. Martín de Santos, T. García Lacarra, *Nutrición Hospitalaria*, 2012, **27**, 1772-1781.
39. F. Massart, F. Micillo, G. Rivezzi, L. Perrone, A. Baggiani, M. Miccoli, V. Meucci, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2016, **98**, 128-136.
40. S. Hickert, M. Bergmann, S. Ersen, B. Cramer, H.-U. Humpf, *Mycotoxin Research*, 2016, **32**, 7-18.
41. EFSA, *EFSA Journal*, 2011, **9**, 2407-2504.
42. A. Solhaug, G. S. Eriksen, J. A. Holme, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2016, **119**, 533-539.
43. R. A. G. Abou-Hany, J. L. Urraca, A. B. Descalzo, L. N. Gómez-Arribas, M. C. Moreno-Bondi, G. Orellana, *Journal of Chromatography A*, 2015, **1425**, 231-239.
44. P. López, D. Venema, T. de Rijk, A. de Kok, J. M. Scholten, H. G. J. Mol, M. de Nijs, *Food Control*, 2016, **60**, 196-204.
45. R. C. Oliveira, S. S. Goncalves, M. S. Oliveira, P. Dilkin, C. A. Mallmann, R. S. Freitas, P. Bianchi, B. Correa, *Food Chemistry*, 2017, **230**, 491-496.
46. M. Gross, S. Asam, M. Rychlik, *Mycotoxin Research*, 2017, **33**, 75-78.
47. D. Kong, L. Liu, S. Song, Q. Zheng, X. Wu, H. Kuang, *Food and Agricultural Immunology*, 2017, **28**, 1293-1303.
48. C. Gruber-Dorninger, B. Novak, V. Nagl, F. Berthiller, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **65**, 7052-7070.
49. T. T. Tung, T. H. Jakobsen, T. T. Dao, A. T. Fuglsang, M. Givskov, S. B. Christensen, J. Nielsen, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, **126**, 1011-1020.
50. *Official Journal of the European Communities* 1993, Council Regulation (ECC) N° 315/93, 37/1-37/3
51. *Official Journal of the European Communities* 1997, European Commission Regulation (EC) N° 194/97, 31/48-31/49.
52. *Official Journal of the European Communities* 2001, European Commission Regulation (EC) N° 466/2001, 77/1-77/13.
53. *Official Journal of the European Union* 2006, European Commission Regulation (EC) N° 1881/2006, 364/5-364/24.
54. *Official Journal of the European Union* 2007, European Commission Regulation (EC) N° 1126/2007, 255/14-255/17.

55. *Official Journal of the European Union* 2010, European Commission Regulation (EC) N° 105/2010, 35/7-35/8.
56. *Official Journal of the European Union* 2010, European Commission Regulation (EC) N° 165/2010, 50/8-50/12.
57. *Official Journal of the European Union* 2012, European Commission Regulation (EC) N° 594/2012, 176/43-176/45.
58. *Official Journal of the European Union* 2012, European Commission Regulation (EC) N° 1058/2012, 313/14-313/15.
59. *Official Journal of the European Union* 2014, European Commission Regulation (EC) N° 212/2014, 67/3-67/4.
60. *Official Journal of the European Union* 2013, European Commission Recommendation 2013/165/EU, 91/12-91/15.
61. *Official Journal of the European Union* 2006, European Commission Regulation (EC) N° 401/2006, 70/12-70/34.
62. *Official Journal of the European Union* 2010, European Commission Regulation (EC) N° 178/2010, 52/32-52/43.
63. *Official Journal of the European Union* 2014, European Commission Regulation (EC) N° 519/2014, 147/29-147/43.
64. T. Zwickel, S. M. Kahl, H. Klaffke, M. Rychlik, M. E. H. Müller, *Toxins*, 2016, **8**, 344-361.
65. EFSA, *EFSA Journal*, 2016, 1-2.
66. Y. Ackermann, V. Curtui, R. Dietrich, M. Gross, H. Latif, E. Märtilbauer, E. Usleber, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**, 6360-6368.
67. O. Lacina, M. Zachariasova, J. Urbanova, M. Vaclavikova, T. Cajka, J. Hajslova, *Journal of Chromatography A*, 2012, **1262**, 8-18.
68. A. Prella, D. Spadaro, A. Garibaldi, M. L. Gullino, *Food Chemistry*, 2013, **140**, 161-167.
69. C. Juan, K. Chamari, S. Oueslati, J. Mañes, *Food Analytical Methods*, 2016, **9**, 1573-1579.
70. H. Shanakhat, A. Sorrentino, A. Raiola, A. Romano, P. Masi, S. Cavella, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, **98**, 4003-4013.
71. A. Alshannaq, J.-H. Yu, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, **14**, 632.

72. J. Diana Di Mavungu, S. Monbaliu, M.-L. Scippo, G. Maghuin-Rogister, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, A. Callebaut, J. Robbens, C. Van Peteghem, S. De Saeger, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2009, **26**, 885-895.
73. E. Janić Hajnal, D. Orčić, A. Torbica, J. Kos, J. Mastilović, M. Škrinjar, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015, **32**, 361-370.
74. E. Njumbe Ediage, J. Diana Di Mavungu, S. Monbaliu, C. Van Peteghem, S. De Saeger, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**, 5173-5180.
75. M. C. Spanjer, P. M. Rensen, J. M. Scholten, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2008, **25**, 472-489.
76. J. Noser, P. Schneider, M. Rother, H. Schmutz, *Mycotoxin Research*, 2011, **27**, 265-271.
77. E. Streit, C. Schwab, M. Sulyok, K. Naehrer, R. Krska, G. Schatzmayr, *Toxins*, 2013, **5**, 504-523.
78. S. Hickert, I. Krug, B. Cramer, H.-U. Humpf, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, **63**, 10879-10884.
79. C. N. Ezekiel, W. A. Abia, I. M. Ogara, M. Sulyok, B. Warth, R. Krska, *LWT - Food Science and Technology*, 2015, **60**, 137-141.
80. J. Walravens, H. Mikula, M. Rychlik, S. Asam, E. N. Ediage, J. D. Di Mavungu, A. Van Landschoot, L. Vanhaecke, S. De Saeger, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1372**, 91-101.
81. E. Njumbe Ediage, C. Van Poucke, S. De Saeger, *Food Chemistry*, 2015, **177**, 397-404.
82. R. F. Magnani, G. D. De Souza, E. Rodrigues-Filho, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**, 4980-4986.
83. K. Zhao, B. Shao, D. Yang, F. Li, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, **63**, 343-348.
84. E. Rodriguez, F. N. Villoslada, M. C. Moreno-Bondi, M. D. Marazuela, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 605-613.
85. A. Mustafa, C. Turner, *Analytica Chimica Acta*, 2011, **703**, 8-18.
86. J. L. Urraca, M. D. Marazuela, M. C. Moreno-Bondi, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **524**, 175-183.
87. D. Chen, X. Cao, Y. Tao, Q. Wu, Y. Pan, L. Huang, X. Wang, Y. Wang, D. Peng, Z. Liu, Z. Yuan, *Journal of Chromatography A*, 2012, **1253**, 110-119.

88. L. Campone, A. L. Piccinelli, R. Celano, M. Russo, A. Valdés, C. Ibáñez, L. Rastrelli, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, **407**, 2899-2911.
89. N. W. Turner, H. Bramhmbhatt, M. Szabo-Vezse, A. Poma, R. Coker, S. A. Piletsky, *Analytica Chimica Acta*, 2015, **901**, 12-33.
90. A. Malachová, M. Sulyok, E. Beltrán, F. Berthiller, R. Krska, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1362**, 145-156.
91. J. A. Shimshoni, O. Cuneah, M. Sulyok, R. Krska, N. Galon, B. Sharir, A. Shlosberg, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2013, **30**, 1614-1625.
92. E. Varga, T. Glauner, F. Berthiller, R. Krska, R. Schuhmacher, M. Sulyok, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, **405**, 5087-5104.
93. M. Á. González-Curbelo, B. Socas-Rodríguez, A. V. Herrera-Herrera, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, M. Á. Rodríguez-Delgado, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, **71**, 169-185.
94. A. Jettanajit, T. Nhujak, *Journal of Chromatographic Science*, 2016, **54**, 720-729.
95. B. Socas-Rodríguez, J. González-Sálamo, A. V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M. Á. Rodríguez-Delgado, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, eds. E. Ibáñez and A. Cifuentes, Elsevier, 2017, vol. 76, pp. 319-374.
96. L. Vaclavik, M. Zachariasova, V. Hrbek, J. Hajslova, *Talanta*, 2010, **82**, 1950-1957.
97. C. K. Myresiotis, S. Testempasis, Z. Vryzas, G. S. Karaoglanidis, E. Papadopoulou-Mourkidou, *Food Chemistry*, 2015, **182**, 81-88.
98. Z. Dzuman, M. Zachariasova, O. Lacina, Z. Veprikova, P. Slavikova, J. Hajslova, *Talanta*, 2014, **121**, 263-272.
99. C. Juan, J. Mañes, G. Font, A. Juan-García, *LWT - Food Science and Technology*, 2017, **86**, 344-351.
100. W. Jia, X. Chu, Y. Ling, J. Huang, J. Chang, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1345**, 107-114.
101. M. Wang, N. Jiang, H. Xian, D. Wei, L. Shi, X. Feng, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1429**, 22-29.
102. L. Vaclavik, M. Vaclavikova, T. H. Begley, A. J. Krynitsky, J. I. Rader, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**, 4822-4830.
103. J. Walravens, H. Mikula, M. Rychlik, S. Asam, T. Devos, E. Njumbe Ediage, J. Diana Di Mavungu, L. Jacxsens, A. Van Landschoot, L. Vanhaecke, S. De Saeger, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64**, 5101-5109.
104. C. Fan, X. Cao, M. Liu, W. Wang, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1436**, 133-140.

105. S. Asam, K. Konitzer, P. Schieberle, M. Rychlik, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, **57**, 5152-5160.
106. S. Asam, K. Konitzer, M. Rychlik, *Mycotoxin Research*, 2011, **27**, 23-28.
107. M. S. Oviedo, G. G. Barros, S. N. Chulze, M. L. Ramirez, *Mycotoxin Research*, 2012, **28**, 169-174.
108. O. F. Kayode, M. Sulyok, S. O. Fapohunda, C. N. Ezekiel, R. Krska, C. R. B. Oguntona, *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2013, **6**, 294-300.
109. M. Á. Pavón, A. Luna, S. de la Cruz, I. González, R. Martín, T. García, *Food Control*, 2012, **25**, 45-52.
110. P. M. Scott, W. Zhao, S. Feng, B. P.-Y. Lau, *Mycotoxin Research*, 2012, **28**, 261-266.
111. S. Wang, L. Cheng, S. Ji, K. Wang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, **98**, 201-209.
112. M. Appell, A. Mueller, *Journal of AOAC International*, 2016, **99**, 861-864.
113. J. L. Urraca, J. F. Huertas-Pérez, G. A. Cazorla, J. Gracia-Mora, A. M. García-Campaña, M. C. Moreno-Bondi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 3033-3042.
114. P. Lucci, S. Moret, S. Bettin, L. Conte, *Journal of Separation Science*, 2017, **40**, 458-465.
115. D. Caputo, G. de Cesare, A. Nascetti, R. Scipinotti, F. Pavanello, R. Arrigoni, *Procedia Engineering*, 2014, **87**, 1354-1357.
116. Y. Rodríguez-Carrasco, J. C. Moltó, H. Berrada, J. Mañes, *Food Chemistry*, 2014, **146**, 212-219.
117. S. C. Cunha, J. O. Fernandes, *Journal of Separation Science*, 2010, **33**, 600-609.
118. G. S. Shephard, *Journal of AOAC International*, 2016, **99**, 842-848.
119. A. G. Frenich, R. Romero-González, M. del Mar Aguilera-Luiz, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, **63**, 158-169.
120. S. J. Hird, B. P. Y. Lau, R. Schuhmacher, R. Krska, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, **59**, 59-72.
121. N. Arroyo-Manzanares, J. Diana Di Mavungu, I. Garrido-Jurado, L. Arce, L. Vanhaecke, E. Quesada-Moraga, S. De Saeger, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, **409**, 3347-3357.
122. V. Uka, G. Moore, N. Arroyo-Manzanares, D. Nebija, S. De Saeger, J. Diana Di Mavungu, *Toxins*, 2017, **9**, 35.

123. W. M. A. Niessen, D. Flack, in *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry*, eds. W. M. A. Niessen and J. Kool, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2015, ch. 1, pp. 1-46.
124. *Official Journal of the European Communities* 2002, European Commission Decision 2002/657/EC, 221/3-221/36.
125. M. De Boevre, J. D. Di Mavungu, P. Maene, K. Audenaert, D. Deforce, G. Haesaert, M. Eeckhout, A. Callebaut, F. Berthiller, C. Van Peteghem, S. De Saeger, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2012, **29**, 819-835.
126. S. Yibadatihan, S. Jinap, N. A. Mahyudin, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2014, **31**, 2071-2079.
127. S. Monbaliu, C. Van Poucke, C. Van Peteghem, K. Van Poucke, K. Heungens, S. De Saeger, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009, **23**, 3-11.
128. L. Lohrey, S. Marschik, B. Cramer, H.-U. Humpf, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**, 114-120.
129. S. Asam, M. Lichtenegger, K. Muzik, Y. Liu, O. Frank, T. Hofmann, M. Rychlik, *Journal of Chromatography A*, 2013, **1289**, 27-36.
130. S. da Motta, L. M. Valente Soares, *Food Chemistry*, 2000, **71**, 111-116.
131. D. Siegel, S. Merkel, M. Koch, I. Nehls, *Food Chemistry*, 2010, **120**, 902-906.
132. Á. Tölgyesi, J. Stroka, V. Tamosiunas, T. Zwickel, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015, **32**, 1512-1522.
133. A. A. Burkin, G. P. Kononenko, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, **47**, 72-76.
134. D. Guan, P. Li, Q. Zhang, W. Zhang, D. Zhang, J. Jiang, *Food Chemistry*, 2011, **125**, 1359-1364.
135. Y. Huang, Y. Xu, Q. He, J. Chu, B. Du, J. Liu, *Food and Agricultural Immunology*, 2014, **25**, 186-199.
136. N. V. Beloglazova, E. S. Speranskaya, A. Wu, Z. Wang, M. Sanders, V. V. Gofman, D. Zhang, I. Y. Goryacheva, S. De Saeger, *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, **62**, 59-65.
137. D. Kong, Z. Xie, L. Liu, S. Song, Q. Zheng, H. Kuang, *Food and Agricultural Immunology*, 2017, **28**, 1082-1093.
138. Katarzyna M. Koczula, A. Gallotta, *Essays in Biochemistry*, 2016, **60**, 111-120.
139. Z. He, Q. He, Y. Xu, Y. Li, X. Liu, B. Chen, D. Lei, C. Sun, *Analytical Chemistry*, 2013, **85**, 10304-10311.

140. Y. Wang, P. Li, Z. Majkova, C. R. S. Bever, H. J. Kim, Q. Zhang, J. E. Dechant, S. J. Gee, B. D. Hammock, *Analytical Chemistry*, 2013, **85**, 8298-8303.
141. R. Peltomaa, E. Benito-Peña, R. Barderas, U. Sauer, M. González Andrade, M. C. Moreno-Bondi, *Analytical Chemistry*, 2017, **89**, 6216-6223.
142. C. N. Ezekiel, R. Bandyopadhyay, M. Sulyok, B. Warth, R. Krska, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2012, **29**, 1288-1299.
143. B. Warth, A. Parich, J. Atehnkeng, R. Bandyopadhyay, R. Schuhmacher, M. Sulyok, R. Krska, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**, 9352-9363.
144. J. Schenzel, H.-R. Forrer, S. Vogelgsang, T. D. Bucheli, *Mycotoxin Research*, 2012, **28**, 135-147.
145. J. Rubert, Z. Dzuman, M. Vaclavikova, M. Zachariasova, C. Soler, J. Hajslova, *Talanta*, 2012, **99**, 712-719.
146. W. A. Abia, B. Warth, M. Sulyok, R. Krska, A. N. Tchana, P. B. Njobeh, M. F. Dutton, P. F. Moundipa, *Food Control*, 2013, **31**, 438-453.
147. M. E. H. Müller, U. Korn, *Food Control*, 2013, **34**, 191-197.
148. L. Broggi, C. Reynoso, S. Resnik, F. Martinez, V. Drunday, Á. R. Bernal, *Mycotoxin Research*, 2013, **29**, 17-22.
149. E. Van de Perre, N. Deschuyffeleer, L. Jacxsens, F. Vekeman, W. Van Der Hauwaert, S. Asam, M. Rychlik, F. Devlieghere, B. De Meulenaer, *Food Control*, 2014, **37**, 165-170.
150. I. R. Pizzutti, A. de Kok, J. Scholten, L. W. Righi, C. D. Cardoso, G. Necchi Rohers, R. C. da Silva, *Talanta*, 2014, **129**, 352-363.
151. A. R. Fontana, L. P. Prendes, V. I. Morata, R. Bottini, *RSC Advances*, 2016, **6**, 95670-95679.
152. T. Dagnac, A. Latorre, B. Fernández Lorenzo, M. Llompарт, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2016, **33**, 1850-1863.
153. M. F. Abdallah, G. Girgin, T. Baydar, R. Krska, M. Sulyok, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, **97**, 4419-4428.
154. J. Zhou, J.-J. Xu, Z.-X. Cai, B.-F. Huang, M.-C. Jin, Y.-P. Ren, *Journal of Chromatography B*, 2017, **1068-1069**, 15-23.
155. M. J. A. Schröder, *Food Quality and Consumer Value*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003.
156. J. J. Baert, J. De Clippeleer, P. S. Hughes, L. De Cooman, G. Aerts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**, 11449-11472.

157. L. Jacxsens, F. Devlieghere, P. Ragaert, E. Vanneste, J. Debevere, *International Journal of Food Microbiology*, 2003, **83**, 263-280.
158. E. K. Paleologos, I. N. Savvaidis, M. G. Kontominas, *Food Microbiology*, 2004, **21**, 549-557.
159. M. Smolander, in *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*, eds. J. Kerry and P. Butler, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, England, First edn., 2008, ch. 7, pp. 111-127.
160. A. Rico-Yuste, V. González-Vallejo, E. Benito-Peña, T. de las Casas Engel, G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, *Analytical Chemistry*, 2016, **88**, 3959-3966.
161. M. C. Cela-Pérez, L. Barbosa-Pereira, X. Vecino, M. Pérez-Ameneiro, A. L. Latorre, J. M. López-Vilariño, M. V. González Rodríguez, A. B. Moldes, J. M. Cruz, *Talanta*, 2015, **135**, 58-66.
162. K. Li, Y. Luo, H. Shen, *International Journal of Food Properties*, 2015, **18**, 205-212.
163. N. Qin, Y. Zhang, Y. Luo, *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, **41**, e12844.
164. L. Wu, Y. Wei, B. Du, L. Chen, Y. Wang, Y. Li, J. Zhao, X. Xue, *LWT - Food Science and Technology*, 2015, **63**, 504-510.
165. R. Fatima, B. Farooqui, R. B. Qadri, *Journal of Food Science*, 1981, **46**, 1125-1127.
166. R. S. Singhal, P. R. Kulkarni, D. V. Rege, in *Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity*, Woodhead Publishing, 1997, ch. 5, pp. 209-299.
167. D. J. Williams, G. E. Mitchell, S. M. Nottingham, S. J. Jarrett, M. Petroff, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1994, **2**, 5-14.
168. J. Spinelli, M. Eklund, D. Miyauchi, *Journal of Food Science*, 1964, **29**, 710-714.
169. N. Vishnu, M. Gandhi, D. Rajagopal, A. S. Kumar, *Analytical Methods*, 2017, **9**, 2265-2274.
170. J. E. Hodge, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1953, **1**, 928-943.
171. C. Delgado-Andrade, I. Seiquer, A. Haro, R. Castellano, M. P. Navarro, *Food Chemistry*, 2010, **122**, 145-153.
172. C. Kanzler, H. Schestkowa, P. T. Haase, L. W. Kroh, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, **65**, 8957-8965.
173. M. Ciulu, I. Floris, V. M. Nurchi, A. Panzanelli, M. I. Pilo, N. Spano, G. Sanna, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, **63**, 4190-4195.
174. F. Sosulski, R. M. Mahmoud, *Cereal Chemistry*, 1979, **56**, 533-536.

175. D. Muñoz Rodríguez, K. Wrobel, K. Wrobel, *European Food Research and Technology*, 2005, **221**, 798-802.
176. F. Lo Coco, V. Novelli, C. Valentini, L. Ceccon, *Journal of Chromatographic Science*, 1997, **35**, 578-583.
177. S. Malfliet, F. Van Opstaele, J. de Clippeleer, E. Syryn, K. Goiris, L. de Cooman, G. Aerts, *Journal of the Institute of Brewing*, 2008, **114**, 180-192.
178. G. Vinci, M. L. Antonelli, *Food Control*, 2002, **13**, 519-524.
179. L. M. L. Nollet, *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*, Blackwell Publishing Ltd., 2012.
180. X. Yang, J. Zhang, Y. Cheng, *SpringerPlus*, 2016, **5**, 1906.
181. B. G. Burns, P. J. Ke, *J Assoc Off Anal Chem*, 1985, **68**, 444-448.
182. J.-H. Cheng, D.-W. Sun, H. Pu, Z. Zhu, *Food Chemistry*, 2015, **185**, 245-253.
183. G. ElMasry, N. Nakazawa, E. Okazaki, S. Nakauchi, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, **228**, 237-250.
184. A. T. Lawal, S. B. Adeloju, *Talanta*, 2012, **100**, 217-228.
185. E. Ferrer, A. Alegría, R. Farré, P. Abellán, F. Romero, *Journal of Chromatography A*, 2002, **947**, 85-95.
186. E. Ferrer, A. Alegría, R. Farré, P. Abellán, F. Romero, *Food Chemistry*, 2005, **89**, 639-645.
187. J. L. Chávez-Servín, A. I. Castellote, M. C. López-Sabater, *Journal of Chromatography A*, 2005, **1076**, 133-140.
188. A. Kuşçu, Ö. Bulantekin, *Journal of Food Science and Technology*, 2016, **53**, 3083-3092.
189. R. Perestrelo, E. Rodriguez, J. S. Câmara, *LWT - Food Science and Technology*, 2017, **76**, 40-47.
190. H. Zhu, J. Zhu, L. Wang, Z. Li, *Journal of Food Science and Technology*, 2016, **53**, 171-183.
191. S. W. Tsai, K. Y. Kao, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2012, **92**, 76-84.
192. E. Teixidó, F. J. Santos, L. Puignou, M. T. Galceran, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1135**, 85-90.

193. G. Carrillo, A. Bravo, C. Zufall, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**, 4403-4411.
194. J. Olšovská, D. Matoulková, M. Dušek, J. Felsberg, M. Jelínková, P. Čejka, K. Štěrbá, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, **65**, 3341-3350.
195. D. Saison, D. P. De Schutter, F. Delvaux, F. R. Delvaux, *Journal of Chromatography A*, 2009, **1216**, 5061-5068.
196. C. B. Steingass, M. P. Glock, V. M. Lieb, R. Carle, *Food Research International*, 2017, **100**, 366-374.
197. L. M. Franklin, D. M. Chapman, E. S. King, M. Mau, G. Huang, A. E. Mitchell, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, **65**, 2549-2563.
198. A. Korkmaz, A. A. Hayaloglu, A. F. Atasoy, *LWT - Food Science and Technology*, 2017, **84**, 842-850.
199. Y. Li, K. Liu, F. Chen, *Food Chemistry*, 2016, **207**, 20-26.
200. E. Marengo, E. Mazzucco, E. Robotti, F. Gosetti, M. Manfredi, G. Calabrese, *Current Analytical Chemistry*, 2017, **13**, 187-201.
201. A. H. Sánchez, A. de Castro, A. López-López, A. Cortés-Delgado, V. M. Beato, A. Montaña, *LWT - Food Science and Technology*, 2017, **75**, 685-691.
202. J. Pico, M. J. Nozal, M. Gómez, J. L. Bernal, *Food Chemistry*, 2016, **206**, 110-118.
203. J. Pico, M. M. Martínez, J. Bernal, M. Gómez, *Food Chemistry*, 2017, **232**, 185-190.
204. F. Yuan, F. He, Y. Qian, J. Zheng, M. C. Qian, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64**, 5717-5723.
205. Y. Zhu, H. J. Klee, P. J. Sarnoski, *Food Chemistry*, 2017, **267**, 337-343.
206. M. Cepeda-Vázquez, D. Blumenthal, V. Camel, B. Rega, *Talanta*, 2017, **164**, 708-715.
207. M.C. Moreno Bondi, M. E. Benito Peña, M. V. Gonzalez de Vallejo Rodríguez, A. Rico Yuste, J. Peña Bahamonde, B. Fité Luis, J. L. Tartera, Spanish patent P201430002, 2014.
208. S. Eerola, R. Hinkkanen, E. Lindfors, T. Hirvi, *Journal of AOAC International*, 1993, **76**, 575-577.
209. M. Křížek, E. Dadáková, F. Vácha, T. Pelikánová, *European Food Research and Technology*, 2017, **243**, 1989-1995.
210. T. M. Ngapo, L. Vachon, *Food Chemistry*, 2017, **233**, 500-506.

211. A. Arulkumar, S. Paramasivam, P. Rameshthangam, M. A. Rabie, *Journal of Food Science and Technology*, 2017, **54**, 2503-2511.
212. J. Yongsawatdigul, W. Wongngam, B. Khampirat, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2016, **25**, 895-904.
213. H. B. Ormanci, F. Arik Colakoglu, *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, **41**, e12736.
214. A. Jastrzębska, S. Kowalska, E. Szłyk, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2016, **33**, 27-40.
215. Ş. Ata, M. Akyüz, H. Çabuk, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, **97**, 1427-1432.
216. V. Sirocchi, G. Caprioli, M. Ricciutelli, S. Vittori, G. Sagratini, *Journal of Mass Spectrometry*, 2014, **49**, 819-825.
217. W. Cheng, D.-W. Sun, J.-H. Cheng, *LWT - Food Science and Technology*, 2016, **73**, 13-19.
218. D. Yang, A. Lu, D. Ren, J. Wang, *Infrared Physics & Technology*, 2017, **86**, 23-34.
219. W. Sheng, C. Sun, G. Fang, X. Wu, G. Hu, Y. Zhang, S. Wang, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64**, 8944-8949.
220. S.-Y. Tseng, S.-Y. Li, S.-Y. Yi, A. Y. Sun, D.-Y. Gao, D. Wan, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, **9**, 17306-17316.
221. T. Lin, Y. Wu, Z. Li, Z. Song, L. Guo, F. Fu, *Analytical Chemistry*, 2016, **88**, 11022-11027.
222. D. Dainelli, N. Gontard, D. Spyropoulos, E. Zondervan-van den Beuken, P. Tobback, *Trends in Food Science & Technology*, 2008, **19**, S103-S112.
223. M. Ghaani, C. A. Cozzolino, G. Castelli, S. Farris, *Trends in Food Science & Technology*, 2016, **51**, 1-11.
224. V. Siracusa, in *Antimicrobial Food Packaging*, ed. J. Barros-Velázquez, Academic Press, San Diego, 2016, ch. 7, pp. 95-106.
225. *Official Journal of the European Union* 2004, European Commission Regulation (EC) N° 1935/2004, 2338/4-338/17.
226. *Official Journal of the European Union* 2009, European Commission Regulation (EC) N° 450/2009, 135/3-135/11.
227. B. Malhotra, A. Keshwani, H. Kharkwal, *Frontiers in Microbiology*, 2015, **6**, 611.

228. G. Mauriello, in *Antimicrobial Food Packaging*, ed. J. Barros-Velázquez, Academic Press, San Diego, 2016, ch. 11, pp. 141-152.
229. A. Valdés, M. Ramos, A. Beltrán, A. Jiménez, M. Garrigós, *Coatings*, 2017, **7**, 56.
230. A. Silva-Weiss, M. Ihl, P. J. A. Sobral, M. C. Gómez-Guillén, V. Bifani, *Food Engineering Reviews*, 2013, **5**, 200-216.
231. P. N. Jensen, G. Sørensen, P. Brockhoff, G. Bertelsen, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 4941-4947.
232. F. Tian, E. A. Decker, J. M. Goddard, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**, 7710-7718.
233. C. López de Dicastillo, C. Nerín, P. Alfaro, R. Catalá, R. Gavara, P. Hernández-Muñoz, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**, 7832-7840.
234. C. Hauser, U. Müller, T. Sauer, K. Augner, M. Pischetsrieder, *Food Chemistry*, 2014, **145**, 608-613.
235. E. C. Frascareli, V. M. Silva, R. V. Tonon, M. D. Hubinger, *Food and Bioproducts Processing*, 2012, **90**, 413-424.
236. I. Ahmed, H. Lin, L. Zou, A. L. Brody, Z. Li, I. M. Qazi, T. R. Pavase, L. Lv, *Food Control*, 2017, **82**, 163-178.
237. K. K. Gaikwad, S. Singh, Y. S. Lee, *Environmental Chemistry Letters*, 2018, **16**, 523-538.
238. P. Suppakul, J. Miltz, K. Sonneveld, S.W. Bigger, *Journal of Food Science*, 2003, **68**, 408-420.
239. *Official Journal of the European Union* 2011, European Commission Regulation (EC) N° 10/2011, 12/1-12/89.
240. *Official Journal of the European Union* 2016, European Commission Regulation (EC) N° 2016/1416, 230/22-230/42.
241. F. Donsì, M. Annunziata, M. Sessa, G. Ferrari, *LWT - Food Science and Technology*, 2011, **44**, 1908-1914.
242. D. M. Granda-Restrepo, H. Soto-Valdez, E. Peralta, R. Troncoso-Rojas, B. Vallejo-Córdoba, N. Gámez-Meza, A. Z. Graciano-Verdugo, *Food Research International*, 2009, **42**, 1396-1402.
243. M. Ramos, A. Beltrán, M. Peltzer, A. J. M. Valente, M. d. C. Garrigós, *LWT - Food Science and Technology*, 2014, **58**, 470-477.
244. L. Sun, L. Lu, X. Qiu, Y. Tang, *Food Control*, 2017, **71**, 193-199.

-
245. N. Lavoine, I. Desloges, J. Bras, *Carbohydrate Polymers*, 2014, **103**, 528-537.
246. N. Lavoine, N. Tabary, I. Desloges, B. Martel, J. Bras, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, **121**, 196-205.
247. N. Lavoine, C. Givord, N. Tabary, I. Desloges, B. Martel, J. Bras, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2014, **26**, 330-340.
248. C. A. Cozzolino, G. Campanella, H. Türe, R. T. Olsson, S. Farris, *Carbohydrate Polymers*, 2016, **143**, 179-187.
249. H. M. C. Azeredo, M. F. Rosa, L. H. C. Mattoso, *Industrial Crops and Products*, 2017, **97**, 664-671.
250. P. Vera, Y. Echegoyen, E. Canellas, C. Nerín, M. Palomo, Y. Madrid, C. Cámara, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 6659-6670.
251. X. Zhai, C. Zhang, G. Zhao, S. Stoll, F. Ren, X. Leng, *Journal of Nanobiotechnology*, 2017, **15**, 4.
252. P. Otero-Pazos, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, R. Sendón, E. Benito-Peña, V. González-Vallejo, M. C. Moreno-Bondi, I. Angulo, P. Paseiro-Losada, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, **62**, 11215-11221.
253. S. Ganiari, E. Choulitoudi, V. Oreopoulou, *Trends in Food Science & Technology*, 2017, **68**, 70-82.
254. W. J. Hurst, J. W. Finley, J. M. deMan, in *Principles of Food Chemistry*, eds. J. M. deMan, J. W. Finley, W. J. Hurst and C. Lee, Springer International Publishing, Cham, Switzerland, Fourth edn., 2018, ch. 15, pp. 527-566.
255. E. N. Frankel, in *Lipid Oxidation*, ed. E. N. Frankel, Woodhead Publishing, 2012, ch. 1, pp. 15-24.
256. J. Kanner, I. Rosenthal, *Pure and Applied Chemistry*, 1992, **64**, 1959-1964.
257. A. J. St. Angelo, J. Vercellotti, T. Jacks, M. Legendre, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1996, **36**, 175-224.
258. E. N. Frankel, in *Lipid Oxidation*, ed. E. N. Frankel, Woodhead Publishing, 2012, ch. 11, pp. 299-354.
259. E. M. Becker, L. R. Nissen, L. H. Skibsted, *European Food Research and Technology*, 2004, **219**, 561-571.
260. M. S. Brewer, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2011, **10**, 221-247.
261. *Official Journal of the European Union* 2008, European Commission Regulation (EC) Nº 1333/2008, 354/16-354/33.

262. *Official Journal of the European Union* 2011, European Commission Regulation (EC) N° 1129/2011, 295/1-295/177.
263. Food and Drugs, 21 C.F.R 2018.
264. L. Karre, K. Lopez, K. J. K. Getty, *Meat Science*, 2013, **94**, 220-227.
265. K. Yogesh, Y. D. Narayan, A. Tanbir, N. Kairam, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015, **14**, 796-812.
266. J. Xie, P. VanAlstyne, A. Uhler, X. Yang, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2017, **119**, 1600439.
267. D. Djenane, *Foods*, 2015, **4**, 208.
268. L. Barbosa-Pereira, G. P. Aurrekoetxea, I. Angulo, P. Paseiro-Losada, J. M. Cruz, *Meat Science*, 2014, **97**, 249-254.
269. C. López-de-Dicastillo, J. Gómez-Estaca, R. Catalá, R. Gavara, P. Hernández-Muñoz, *Food Chemistry*, 2012, **131**, 1376-1384.
270. E. Benito-Peña, V. González-Vallejo, A. Rico-Yuste, L. Barbosa-Pereira, J. M. Cruz, A. Bilbao, C. Alvarez-Lorenzo, M. C. Moreno-Bondi, *Food Chemistry*, 2016, **190**, 487-494.
271. T. Bolumar, D. LaPena, L. H. Skibsted, V. Orlien, *Food Packaging and Shelf Life*, 2016, **7**, 26-33.
272. H. M. Manukumar, S. Umesha, *Food Research International*, 2017, **102**, 144-155.
273. M. Moudache, C. Nerín, M. Colon, F. Zaidi, *Food Chemistry*, 2017, **229**, 98-103.
274. N. Benbettaieb, C. Tanner, P. Cayot, T. Karbowiak, F. Debeaufort, *Food Chemistry*, 2018, **242**, 369-377.
275. L. E. Moura, C. O. Souza, E. A. S. de Oliveira, P. V. F. Lemos, J. I. Druzian, *Journal of Applied Polymer Science*, 2018, **135**, 46461.
276. R. Q. Assis, C. H. Pagno, T. M. H. Costa, S. H. Flôres, A. d. O. Rios, *Packaging Technology and Science*, 2018, **31**, 157-166.
277. N. D. Stebbins, M. M. Moy, J. J. Faig, K. E. Uhrich, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2017, **32**, 196-208.
278. N. Kumar, V. Pruthi, *Biotechnology Reports*, 2014, **4**, 86-93.
279. N. Moura-Nunes, T. C. Brito, N. D. d. Fonseca, P. F. de Aguiar, M. Monteiro, D. Perrone, A. G. Torres, *Food Chemistry*, 2016, **199**, 105-113.

-
280. S. Coghe, K. Benoot, F. Delvaux, B. Vanderhaegen, F. R. Delvaux, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**, 602-608.
281. S. Ou, K.-C. Kwok, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, **84**, 1261-1269.
282. M. Lentz, *Fermentation*, 2018, **4**, 20.
283. W. Kunze, *Technology Brewing and Malting*, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin, Germany, Third edn., 2004.
284. L. Barbosa-Pereira, A. Bilbao, P. Vilches, I. Angulo, J. Lluís, B. Fité, P. Paseiro-Losada, J. M. Cruz, *Food Chemistry*, 2014, **145**, 191-197.
285. S. I. Mussatto, in *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*, eds. P. Singh and N. Nigam and A. Pandey, Springer Netherlands, Dordrecht, 2009, pp. 313-326.
286. L. Jelínek, M. Karabín, B. Kotlíková, T. Hudcová, P. Dostálek, *Journal of the Institute of Brewing*, 2014, **120**, 99-104.
287. A. Borges, C. Ferreira, M. J. Saavedra, M. Simões, *Microbial Drug Resistance*, 2013, **19**, 256-265.
288. S. Carrasco, E. Benito-Peña, F. Navarro-Villoslada, J. Langer, M. N. Sanz-Ortiz, J. Reguera, L. M. Liz-Marzán, M. C. Moreno-Bondi, *Chemistry of Materials*, 2016, **28**, 7947-7954.
289. P. Ehrlich, *Proceedings of the Royal Society of London*, 1899, **66**, 424-448.
290. L. Pauling, *Chemical & Engineering News Archive*, 1946, **24**, 1064-1065.
291. L. Pauling, D. H. Campbell, *Science*, 1942, **95**, 440-441.
292. M. V. Polyakov, *Zhurnal Fizieskoj Khimii/Akademiya SSSR*, 1931, **2**, 799-805.
293. F. H. Dickey, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1949, **35**, 227-229.
294. G. Wulff, A. Sarhan, *Angewandte Chemie*, 1972, **84**, 364-364.
295. L. Andersson, B. Sellaergren, K. Mosbach, *Tetrahedron Letters*, 1984, **25**, 5211-5214.
296. M. J. Whitcombe, M. E. Rodriguez, P. Villar, E. N. Vulfson, *Journal of the American Chemical Society*, 1995, **117**, 7105-7111.
297. M. E. Byrne, K. Park, N. A. Peppas, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**, 149-161.

298. C. Alexander, H. S. Andersson, L. I. Andersson, R. J. Ansell, N. Kirsch, I. A. Nicholls, J. O'Mahony, M. J. Whitcombe, *Journal of Molecular Recognition*, 2006, **19**, 106-180.
299. R. J. Uempleby II, S. C. Baxter, A. M. Rampey, G. T. Rushton, Y. Chen, K. D. Shimizu, *Journal of Chromatography B*, 2004, **804**, 141-149.
300. A. Poma, A. Guerreiro, S. Caygill, E. Moczko, S. Piletsky, *RSC Advances*, 2014, **4**, 4203-4206.
301. M. Moreno-Bondi, C., F. Navarro-Villoslada, E. Benito-Pena, J. L. Urraca, *Current Analytical Chemistry*, 2008, **4**, 316-340.
302. C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, *Journal*, 2013, **1**, 41.
303. G. n. Wulff, *Pure and Applied Chemistry*, 1982, **54**, 2093-2102.
304. L. I. Andersson, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, **745**, 3-13.
305. H. Burri, D. Yu, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2015, **8**, 805-814.
306. A. Mujahid, F. L. Dickert, in *Molecularly Imprinted Catalysts*, eds. S. Cao, S. A. Piletsky and A. P. F. Turner, Elsevier, Amsterdam, 2016, pp. 79-101.
307. G. Wulff, *Chemical Reviews*, 2002, **102**, 1-28.
308. A. G. Mayes, M. J. Whitcombe, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 1742-1778.
309. J. L. Urraca, M. D. Marazuela, E. R. Merino, G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1116**, 127-134.
310. E. Benito-Peña, F. Navarro-Villoslada, S. Carrasco, S. Jockusch, M. F. Ottaviani, M. C. Moreno-Bondi, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, **7**, 10966-10976.
311. X. Wei, A. Samadi, S. M. Husson, *Separation Science and Technology*, 2005, **40**, 109-129.
312. W. Wan, S. Wagner, K. Rurack, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 1753-1771.
313. Ş. Karaman Ersoy, E. Tütem, K. Sözgen Başkan, R. Apak, C. Nergiz, *Journal of Chromatography B*, 2016, **1017-1018**, 89-100.
314. J. U. Klein, M. J. Whitcombe, F. Mulholland, E. N. Vulfson, *Angewandte Chemie International Edition*, 1999, **38**, 2057-2060.
315. B. Sellergren, L. Andersson, *The Journal of Organic Chemistry*, 1990, **55**, 3381-3383.

-
316. J. Czulak, A. Jakubiak-Marcinkowska, A. Trochimczuk, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013, **2013**, 9.
317. L. Armelao, S. Quici, F. Barigelletti, G. Accorsi, G. Bottaro, M. Cavazzini, E. Tondello, *Coordination Chemistry Reviews*, 2010, **254**, 487-505.
318. Y.-M. Luo, J. Li, L.-X. Xiao, R.-R. Tang, X.-C. Tang, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, **72**, 703-708.
319. H. Kim, Y. Kim, J. Y. Chang, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2012, **50**, 4990-4994.
320. E. Piletska, D. Cowieson, C. Legge, A. Guerreiro, K. Karim, S. Piletsky, *Analytical Methods*, 2013, **5**, 6954-6959.
321. P. A. G. Cormack, A. Z. Elorza, *Journal of Chromatography B*, 2004, **804**, 173-182.
322. A. Rechichi, C. Cristallini, U. Vitale, G. Ciardelli, N. Barbani, G. Vozzi, P. Giusti, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2007, **11**, 1367-1376.
323. E. Yilmaz, K. Mosbach, K. Haupt, *Analytical Communications*, 1999, **36**, 167-170.
324. S. A. Piletsky, H. S. Andersson, I. A. Nicholls, *Macromolecules*, 1999, **32**, 633-636.
325. E. Benito-Peña, S. Martins, G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, **393**, 235-245.
326. X. Huang, H. Zou, X. Chen, Q. Luo, L. Kong, *Journal of Chromatography A*, 2003, **984**, 273-282.
327. S. Ansari, M. Karimi, *Talanta*, 2017, **164**, 612-625.
328. A. Pardo, T. Josse, L. Mespouille, B. Blankert, P. Dubois, P. Duez, *Phytochemical Analysis*, 2017, **28**, 289-296.
329. J. Zhang, J. Ma, X. Yue, X. Bu, Y. Han, *Journal of Applied Polymer Science*, 2012, **124**, 723-728.
330. J. Liang, Y. Wu, J. Deng, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**, 12494-12503.
331. Y. Nakamura, S. Masumoto, A. Kubo, H. Matsunaga, J. Haginaka, *Journal of Chromatography A*, 2017, **1516**, 71-78.
332. J. L. Urraca, M. Castellari, C. A. Barrios, M. C. Moreno-Bondi, *Journal of Chromatography A*, 2014, **1343**, 1-9.
333. J. Zdunek, E. Benito-Peña, A. Linares, A. Falcimaigne-Cordin, G. Orellana, K. Haupt, M. C. Moreno-Bondi, *Chemistry – A European Journal*, 2013, **19**, 10209-10216.

334. F. Ruggieri, A. A. D'Archivio, D. Camillo, L. Lozzi, M. A. Maggi, R. Mercurio, S. Santucci, *Journal of Separation Science*, 2015, **38**, 1402-1410.
335. A. B. Descalzo, C. Somoza, M. C. Moreno-Bondi, G. Orellana, *Analytical Chemistry*, 2013, **85**, 5316-5320.
336. M. P. Chantada-Vázquez, J. Sánchez-González, E. Peña-Vázquez, M. J. Tabernero, A. M. Bermejo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **75**, 213-221.
337. A. Biffis, G. Dvorakova, A. Falcimaigne-Cordin, in *Molecular Imprinting*, ed. K. Haupt, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012, pp. 29-82.
338. C. Alvarez-Lorenzo, H. Hiratani, J. L. Gómez-Amoza, R. Martínez-Pacheco, C. Souto, A. Concheiro, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, **91**, 2182-2192.
339. D. Carboni, K. Flavin, A. Servant, V. Gouverneur, M. Resmini, *Chemistry – A European Journal*, 2008, **14**, 7059-7065.
340. A. R. Guerreiro, I. Chianella, E. Piletska, M. J. Whitcombe, S. A. Piletsky, *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, **24**, 2740-2743.
341. F. Canfarotta, A. Poma, A. Guerreiro, S. Piletsky, *Nat. Protocols*, 2016, **11**, 443-455.
342. E. Moczko, A. Poma, A. Guerreiro, I. Perez de Vargas Sansalvador, S. Caygill, F. Canfarotta, M. J. Whitcombe, S. Piletsky, *Nanoscale*, 2013, **5**, 3733-3741.
343. K. Smolinska-Kempisty, A. Guerreiro, F. Canfarotta, C. Cáceres, M. J. Whitcombe, S. Piletsky, *Scientific Reports*, 2016, **6**, 37638.
344. G. de los Santos-Villarreal, L. E. Elizalde, in *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing*, John Wiley & Sons, Inc., 2013, ch. 16, pp. 335-354.
345. R. J. Glisoni, M. J. García-Fernández, M. Pino, G. Gutkind, A. G. Moglioni, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, A. Sosnik, *Carbohydrate Polymers*, 2013, **93**, 449-457.
346. M. Jakusch, M. Janotta, B. Mizaikoff, K. Mosbach, K. Haupt, *Analytical Chemistry*, 1999, **71**, 4786-4791.
347. M. Sibrian-Vazquez, D. A. Spivak, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2004, **42**, 3668-3675.
348. U. Skogsberg, C. Meyer, J. Rehbein, G. Fischer, S. Schauff, N. Welsch, K. Albert, A. J. Hall, B. Sellergren, *Polymer*, 2007, **48**, 229-238.
349. T. Kamra, S. Chaudhary, C. Xu, L. Montelius, J. Schnadt, L. Ye, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, **461**, 1-8.

-
350. B. Schweiger, J. Kim, Y. J. Kim, M. Ulbricht, *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2015, **15**, 4870-4889.
351. S. J. Ahmadi, O. Noori-Kalkhoran, S. Shirvani-Arani, *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **175**, 193-197.
352. V. Canalejas-Tejero, S. Carrasco, F. Navarro-Villoslada, J. L. Garcia Fierro, M. d. C. Capel-Sanchez, M. C. Moreno-Bondi, C. A. Barrios, *Journal of Materials Chemistry C*, 2013, **1**, 1392-1398.
353. M. Gagliardi, A. Bertero, A. Bifone, *Scientific Reports*, 2017, **7**, 40046.
354. A. M. Rosengren, B. C. G. Karlsson, I. A. Nicholls, *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**, 1207-1217.
355. J. Chen, L.-Y. Bai, K.-F. Liu, R.-Q. Liu, Y.-P. Zhang, *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, **15**, 574-587.
356. P. Sikiti, T. A. M. Msagati, B. B. Mamba, A. K. Mishra, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2014, **12**, 82-82.
357. H. Lalo, C. Ayela, E. Dague, C. Vieu, K. Haupt, *Lab on a Chip*, 2010, **10**, 1316-1318.
358. S. Carrasco, E. Benito-Pena, D. R. Walt, M. C. Moreno-Bondi, *Chemical Science*, 2015, **6**, 3139-3147.
359. M. Zhao, X. Chen, H. Zhang, H. Yan, H. Zhang, *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 1663-1675.
360. N. Griffete, J. Fresnais, A. Espinosa, C. Wilhelm, A. Bee, C. Menager, *Nanoscale*, 2015, **7**, 18891-18896.
361. C. Baggiani, G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Tozzi, L. Anfossi, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **504**, 43-52.
362. K. Balamurugan, K. Gokulakrishnan, T. Prakasam, *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ*, 2012, **20**, 53-61.
363. T. Zhou, T. Kamra, L. Ye, *Journal of Molecular Recognition*, 2017, **31**, e2608.
364. M. D. Luaces, J. L. Urraca, M. C. Pérez-Conde, N. C. M. Alfonso, A. C. Valdés-González, A. M. Gutiérrez, M. C. Moreno-Bondi, *Microchemical Journal*, 2013, **110**, 458-464.
365. A. Gomez-Caballero, G. Diaz-Diaz, O. Bengoetxea, A. Quintela, N. Unceta, M. A. Goicolea, R. J. Barrio, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1451**, 23-32.
366. T. Martinez-Sena, S. Armenta, M. d. I. Guardia, F. A. Esteve-Turrillas, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, **131**, 48-53.

367. L. Drabova, J. Pulkrabova, K. Kalachova, M. Tomaniova, V. Kocourek, J. Hajslova, *Talanta*, 2012, **100**, 207-216.
368. C. Blasco, Y. Picó, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**, 11005-11014.
369. N. González, M. Grünhut, I. Šrámková, A. G. Lista, B. Horstkotte, P. Solich, H. Sklenářová, C. C. Acebal, *Talanta*, 2018, **178**, 934-942.
370. W. Boonjob, H. Sklenářová, F. J. Lara, A. M. García-Campaña, P. Solich, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, **406**, 4207-4215.
371. W. Wongniramaikul, A. Choodum, L. Dennany, N. N. Daeid, *Journal of Separation Science*, 2012, **35**, 3332-3339.
372. E. Piletska, K. Karim, R. Coker, S. Piletsky, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 2543-2547.
373. P. Lucci, D. Derrien, F. Alix, C. Pérollier, S. Bayoudh, *Analytica Chimica Acta*, 2010, **672**, 15-19.
374. R. K. Mishra, A. Hayat, G. Catanante, G. Istamboulie, J.-L. Marty, *Food Chemistry*, 2016, **192**, 799-804.
375. M. Bryła, M. Roszko, K. Szymczyk, R. Jędrzejczak, M. W. Obiedziński, *Food Control*, 2016, **59**, 619-627.
376. M. Dallio, M. Masarone, S. Errico, A. G. Gravina, C. Nicolucci, R. Di Sarno, L. Gionti, C. Tuccillo, M. Persico, P. Stiuso, N. Diano, C. Loguercio, A. Federico, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2018, **47**, 826-837.
377. R. Bousoumah, J. P. Antignac, V. Camel, M. Grimaldi, P. Balaguer, F. Courant, E. Bichon, M.-L. Morvan, B. Le Bizec, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, **407**, 8713-8723.
378. B. Claude, R. Nehmé, P. Morin, *Analytica Chimica Acta*, 2011, **699**, 242-248.
379. Z. Y. Dong, J. Q. Liu, in *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications*, eds. W. Kutner and P. S. Sharma, The Royal Society of Chemistry, Croydon, UK, First edn., 2018, ch. 11, pp. 359-378.
380. S. Li, M. Zhu, M. J. Whitcombe, Sergey A. Piletsky, A. P. F. Turner, in *Molecularly Imprinted Catalysts*, eds. S. Li, S. Cao, Sergey A. Piletsky and A. P. F. Turner, Elsevier, Amsterdam, 2016, ch. 1, pp. 1-17.
381. J. Matsui, I. A. Nicholls, I. Karube, K. Mosbach, *The Journal of Organic Chemistry*, 1996, **61**, 5414-5417.
382. C. Philip, K. S. Devaky, *Molecular Catalysis*, 2017, **436**, 276-284.

383. X. Shen, C. Huang, S. Shinde, K. K. Jagadeesan, S. Ekström, E. Fritz, B. Sellergren, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**, 30484-30491.
384. Y. Yuan, Y. Yang, M. Faheem, X. Zou, X. Ma, Z. Wang, Q. Meng, L. Wang, S. Zhao, G. Zhu, *Advanced Materials*, 2018, **30**, 1800069.
385. M. Bach, G. n. E. M. T. Tovar, A. Weber, in *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, eds. C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, Smithers Rapra, Shrewsbury, U.K., 1st edn., 2013, ch. 6, pp. 229-258.
386. R. J. Krupadam, M. S. Khan, S. R. Wate, *Water Research*, 2010, **44**, 681-688.
387. A. Murray, B. Örmeci, *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, **19**, 3820-3830.
388. C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, in *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, eds. C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, Smithers Rapra, Shrewsbury, U.K., 1st edn., 2013, ch. 8, pp. 309-350.
389. A. L. M. Ruela, E. C. de Figueiredo, F. C. Carvalho, M. B. de Araújo, G. R. Pereira, *European Polymer Journal*, 2018, **100**, 67-76.
390. L.-P. Zhang, X.-X. Tan, Y.-P. Huang, Z.-S. Liu, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2018, **127**, 150-158.
391. G. Marcelo, I. C. Ferreira, R. Viveiros, T. Casimiro, *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, **542**, 125-131.
392. A. Kushwaha, S. Singh, N. Gupta, A. K. Singh, M. Singh, *Polymer Bulletin*, 2018, DOI: 10.1007/s00289-018-2326-x.
393. A. R. Fareghi, P. N. Moghadam, J. Khalafy, *Starch - Stärke*, 2017, **69**, 1700002.
394. X.-L. Wang, H.-F. Yao, X.-Y. Li, X. Wang, Y.-P. Huang, Z.-S. Liu, *RSC Advances*, 2016, **6**, 94038-94047.
395. M. C. Moreno-Bondi, E. Benito-Pena, S. Carrasco, J. L. Urraca, in *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications*, eds. W. Kutner and P. S. Sharma, The Royal Society of Chemistry, First edn., 2018, ch. 8, pp. 227-281.
396. X. Tan, Q. Hu, J. Wu, X. Li, P. Li, H. Yu, X. Li, F. Lei, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, **220**, 216-221.
397. B. S. Ebarvia, I. E. Ubando, F. B. Sevilla Iii, *Talanta*, 2015, **144**, 1260-1265.
398. M. Behbahani, S. Salimi, H. S. Abandansari, F. Omid, M. Salarian, A. Esrafil, *RSC Advances*, 2015, **5**, 59912-59920.
399. M. V. Foguel, X.-A. Ton, M. V. B. Zanoni, M. D. P. T. Sotomayor, K. Haupt, B. Tse Sum Bui, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, **218**, 222-228.

400. C. Liang, H. Wang, K. He, C. Chen, X. Chen, H. Gong, C. Cai, *Talanta*, 2016, **160**, 360-366.
401. W. Lu, X. Dong, L. Qiu, Z. Yan, Z. Meng, M. Xue, X. He, X. Liu, *Journal of Hazardous Materials*, 2017, **326**, 130-137.
402. M. P. Chantada-Vázquez, C. de-Becerra-Sánchez, A. Fernández-del-Río, J. Sánchez-González, A. M. Bermejo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, *Talanta*, 2018, **181**, 232-238.
403. Y.-c. Wan, Y.-j. Liu, C. Liu, H.-t. Ma, H.-f. Yu, J.-w. Kang, C.-l. Gao, Z.-q. Wu, D. Zheng, B. Lu, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, **154**, 75-84.
404. Y. Wang, J. Wang, R. Cheng, L. Sun, X. Dai, Y. Yan, *Journal of Separation Science*, 2018, **41**, 1880-1887.
405. F. Canfarotta, A. Cecchini, S. Piletsky, in *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications*, eds. W. Kutner and P. S. Sharma, The Royal Society of Chemistry, First edn., 2018, ch. 1, pp. 1-27.
406. I. Chianella, A. Guerreiro, E. Moczko, J. S. Caygill, E. V. Piletska, I. M. P. De Vargas Sansalvador, M. J. Whitcombe, S. A. Piletsky, *Analytical Chemistry*, 2013, **85**, 8462-8468.
407. Y. Garcia, K. Smolinska-Kempisty, E. Pereira, E. Piletska, S. Piletsky, *Analytical Methods*, 2017, **9**, 4592-4598.
408. S.-P. Tang, F. Canfarotta, K. Smolinska-Kempisty, E. Piletska, A. Guerreiro, S. Piletsky, *Analytical Methods*, 2017, **9**, 2853-2858.
409. H. Munawar, K. Smolinska-Kempisty, A. G. Cruz, F. Canfarotta, E. Piletska, K. Karim, S. Piletsky, *Analyst*, 2018, **143**, 3481-3488.
410. B. Danylec, L. Schwarz, S. Harris, R. Boysen, M. Hearn, *Molecules*, 2015, **20**, 17601.
411. A. N. Baeza, J. L. Urraca, R. Chamorro, G. Orellana, M. Castellari, M. C. Moreno-Bondi, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1474**, 121-129.
412. C. Alvarez-Lorenzo, F. Yañez, R. Barreiro-Iglesias, A. Concheiro, *Journal of Controlled Release*, 2006, **113**, 236-244.
413. M. C. Moreno-Bondi, J. L. Urraca, S. Carrasco, F. Navarro Villoslada, in *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, eds. C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, Smithers Rapra, Shrewsbury, U.K., 1st edn., 2013, ch. 2, pp. 23-66.
414. A. Ribeiro, F. Veiga, D. Santos, J. J. Torres-Labandeira, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 701-709.
415. F. Yañez, A. Chauhan, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, *Journal of Applied Polymer Science*, 2011, **122**, 1333-1340.

416. M. Polk, T. L. Vigo, A. Turbak, in *Encyclopedia of Polymer Science, Concise*, ed. H. F. Mark, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, 2013, pp. 557-563.
417. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *LWT - Food Science and Technology*, 1995, **28**, 25-30.
418. A. Ayar, M. Özcan, A. Akgül, N. Akin, *Journal of Food Lipids*, 2001, **8**, 15-25.
419. E. M. Ahmed, *Journal of Advanced Research*, 2015, **6**, 105-121.
420. M. L. Gómez, R. J. J. Williams, H. A. Montejano, C. M. Previtali, *Express Polymer Letters*, 2012, **6**, 189-197.
421. O. L. Brady, G. V. Elsmie, *Analyst*, 1926, **51**, 77-78.
422. W. R. Fernell, H. K. King, *Analyst*, 1953, **78**, 80-83.
423. T. Seliwanoff, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1887, **20**, 181-182.
424. J. Stenhouse, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1870, **156**, 197-205.
425. U. Mandi, A. S. Roy, B. Banerjee, S. M. Islam, *RSC Advances*, 2014, **4**, 42670-42681.
426. S. J. Coles, P. A. Gale, M. B. Hursthouse, M. E. Light, C. N. Warriner, *Supramolecular Chemistry*, 2004, **16**, 469-486.
427. B. Vanderhaegen, H. Neven, S. Coghe, K. J. Verstrepen, H. Verachtert, G. Derdelinckx, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 6782-6790.
428. G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, A. B. Descalzo, J. L. Urraca, R. A. G. Abou Hany, PCT patent WO 2013/144394A1, 2013.
429. M. Bayle, C. Roques, B. Marion, M. Audran, C. Oiry, F. M. M. Bressolle-Gomeni, G. Cros, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, **131**, 33-39.
430. P. Charisiadis, V. Kontogianni, C. Tsiafoulis, A. Tzakos, M. Siskos, I. Gerothanassis, *Molecules*, 2014, **19**, 13643.
431. S. Monbaliu, C. Van Poucke, C. I. Detavernier, F. Dumoulin, M. Van De Velde, E. Schoeters, S. Van Dyck, O. Averkieva, C. Van Peteghem, S. De Saeger, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**, 66-71.
432. L. P. Prendes, A. R. Fontana, M. G. Merín, A. D' Amario Fernández, R. Bottini, M. L. Ramirez, V. I. Morata de Ambrosini, *Food Science & Nutrition*, 2018, **6**, 523-531.
433. M.-H. Lebrun, P. Duvert, F. Gaudemer, A. Gaudemer, C. Deballon, P. Boucly, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1985, **24**, 167-181.
434. S. V. Eliseeva, J.-C. G. Bünzli, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 189-227.

435. C. Piguet, J.-C. G. Bünzli, B. Donnio, D. Guillon, *Chemical Communications*, 2006, **0**, 3755-3768.
436. R. D. Adati, S. A. M. Lima, M. R. Davolos, M. Jafelicci, *Journal of Alloys and Compounds*, 2006, **418**, 222-225.
437. C. B. Smith, J. E. Anderson, J. D. Edwards, K. C. Kam, *Applied Spectroscopy*, 2011, **65**, 866-875.
438. A. Rico-Yuste, J. Walravens, J. L. Urraca, R. A. G. Abou-Hany, A. B. Descalzo, G. Orellana, M. Rychlik, S. De Saeger, M. C. Moreno-Bondi, *Food Chemistry*, 2018, **243**, 357-364.
439. C. Yang, J. Luo, J. Ma, M. Lu, L. Liang, B. Tong, *Dyes and Pigments*, 2012, **92**, 696-704.
440. A. I. Petrov, M. A. Lutoshkin, I. V. Taydakov, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2015, **2015**, 1074-1082.
441. G. E. Southard, K. A. Van Houten, E. W. Ott, G. M. Murray, *Analytica Chimica Acta*, 2007, **581**, 202-207.
442. G. Baryshnikov, B. Minaev, H. Ågren, *Chemical Reviews*, 2017, **117**, 6500-6537.
443. P. Nockemann, E. Beurer, K. Driesen, R. Van Deun, K. Van Hecke, L. Van Meervelt, K. Binnemans, *Chemical Communications*, 2005, **0**, 4354-4356.
444. N. B. D. Lima, A. I. S. Silva, P. C. Gerson, Jr., S. M. C. Gonçalves, A. M. Simas, *PLoS ONE*, 2016, **10**, e0143998.
445. C.-S. Yun, T. Motoyama, H. Osada, *ACS Chemical Biology*, 2017, **12**, 2270-2274.
446. J. Wackerlig, R. Schirhagl, *Analytical Chemistry*, 2016, **88**, 250-261.
447. W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968, **26**, 62-69.
448. K. S. Rao, K. El-Hami, T. Kodaki, K. Matsushige, K. Makino, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, **289**, 125-131.
449. A. Liberman, N. Mendez, W. C. Trogler, A. C. Kummel, *Surface Science Reports*, 2014, **69**, 132-158.
450. J.-H. Lim, S.-W. Ha, J.-K. Lee, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2012, **33**, 1067-1070.
451. R. Sato-Berru, J. M. Saniger, J. O. Flores, M. Sánchez-Espindola, *Journal of Materials Science and Engineering A*, 2013, **3**, 237-242.
452. E. Armstrong, C. O'Dwyer, *Journal of Materials Chemistry C*, 2015, **3**, 6109-6143.

- 453. D. Braun, H. Cherdron, M. Rehahn, H. Ritter, B. Voit, in *Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments*, eds. D. Braun, H. Cherdron, M. Rehahn, H. Ritter and B. Voit, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013, pp. 149-258.
- 454. K. Matyjaszewski, in *Controlled and Living Polymerizations*, eds. A. H. E. Müller and K. Matyjaszewski, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010, ch. 3, pp. 103-166.
- 455. H. Kempe, A. Parareda Pujolràs, M. Kempe, *Pharmaceutical Research*, 2015, **32**, 375-388.
- 456. A. Peled, A. Pevzner, H. Peretz Soroka, F. Patolsky, *Journal of Nanobiotechnology*, 2014, **12**, 7-7.

